

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***Aspergillus* fajok mitokondriális mangán SOD génjeinek
összehasonlító funkció vizsgálata**

Pákozdi Klaudia Gréta

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

TARTALOM

| | |
|---|----|
| 1. Rövidítések jegyzéke | 4 |
| 2. Bevezetés | 7 |
| 3. Szakirodalmi áttekintés | 9 |
| 3.1. Az <i>Aspergillus nidulans</i> és az <i>Aspergillus fumigatus</i> a kutatásokban | 9 |
| 3.2. Az oxidatív stressz | 10 |
| 3.3. Az oxidatív stressz elleni védekezés | 11 |
| 3.4. A SOD enzimek | 13 |
| 3.4.1. Az MnSOD enzim különböző fajokban | 14 |
| 3.4.2. Az MnSOD-ok az <i>Aspergillus</i> nemzetségben | 15 |
| 3.5. A menadion nátrium-biszulfit (MSB) | 17 |
| 3.6. Deferipron és vashiányos környezet..... | 17 |
| 4. Célkitűzések..... | 18 |
| 5. Anyagok és módszerek | 20 |
| 5.1. A két <i>Aspergillus</i> faj mangán SOD génjének összehasonlítása | 20 |
| 5.2. A kísérletekben felhasznált törzsek és tenyésztésük | 21 |
| 5.3. Micélium előállítása RNS izolálásához..... | 22 |
| 5.4. A szilárd táptalajon végzett stresszkísérletek körülményei..... | 22 |
| 5.5. Minták előállítása szuperoxid képződés és SOD-aktivitás mérésre..... | 23 |
| 5.6. A szuperoxid képződés mérése | 23 |
| 5.7. A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás mérése | 24 |
| 5.8. A fehérjetartalom meghatározása | 24 |
| 5.9. <i>A. fumigatus</i> konídiumok túlélése makrofágokkal szemben | 24 |
| 5.10. Az RNS izolálás menete..... | 25 |
| 5.11. A nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás menete..... | 25 |
| 5.12. A szekvencia adatok feldolgozása (RNAseq) | 26 |
| 5.13. A transzkriptomikai adatok kiértékelése | 27 |
| 5.13.1. Az <i>A. nidulans</i> adatok elemzése..... | 27 |
| 5.13.2. Az <i>A. fumigatus</i> adatok elemzése..... | 28 |
| 5.14. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR) | 29 |
| 6. Eredmények..... | 32 |
| 6.1. A két <i>Aspergillus</i> faj mangán tartalmú SOD génjének összehasonlítása..... | 32 |
| 6.2. Az <i>A. nidulans</i> -szal végzett kísérletek eredményei..... | 34 |
| 6.2.1. Intracelluláris szuperoxid képződés és SOD aktivitások <i>A. nidulans</i> -ban | 36 |
| 6.2.2. Az <i>A. nidulans</i> transzkriptom szekvenálási adatainak kiértékelése | 36 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6.2.3. | Az MSB-kezelés hatása a transzkriptomra <i>A. nidulans</i> -ban | 38 |
| 6.2.4. | A <i>sodB</i> deléció hatása a transzkriptomra <i>A. nidulans</i> -ban | 42 |
| 6.3. | Az <i>A. fumigatus</i> -szal végzett kísérletek eredményei..... | 46 |
| 6.3.1. | Az <i>A. fumigatus</i> érzékenysége a vaslimitációra | 46 |
| 6.3.2. | Az <i>A. fumigatus</i> makrofágokkal szembeni érzékenysége | 47 |
| 6.3.3. | Az <i>A. fumigatus</i> érzékenysége MSB-re..... | 48 |
| 6.3.4. | Intracelluláris szuperoxid képződés és SOD aktivitások <i>A. fumigatus</i> -ban | 50 |
| 6.3.5. | Az <i>A. fumigatus</i> transzkriptom szekvenálási adatainak kiértékelése | 50 |
| 6.3.6. | Az MSB hatása a transzkriptomra <i>A. fumigatus</i> -ban | 52 |
| 6.3.7. | A <i>sod2</i> deléció hatása a transzkriptomra <i>A. fumigatus</i> -ban..... | 57 |
| 6.3.8. | További <i>sod</i> gének expressziójának vizsgálata | 59 |
| 7. | Eredmények megbeszélése | 60 |
| 7.1. | Tenyésztési körülmények fontossága..... | 61 |
| 7.2. | Az <i>A. nidulans</i> transzkriptomikai eredményeinek megbeszélése | 63 |
| 7.3. | Az <i>A. fumigatus</i> transzkriptomikai eredményeinek megbeszélése | 67 |
| 8. | Konklúzió | 70 |
| 9. | Összefoglalás | 71 |
| 10. | Summary | 72 |
| 11. | Irodalomjegyzék | 74 |
| 12. | Tárgyszavak | 89 |
| 13. | Köszönetnyilvánítás | 90 |
| 14. | Mellékletek | 92 |
| 15. | Függelék | 97 |

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|---------------|---|
| *OH | hidroxilgyök |
| | adatbázis (“Research Collaboratory for Structural Bioinformatics-Protein Data Bank”) |
| AlphaFold 2 | fehérjeszerkezet előrejelző (“Protein Structure Prediction System”) |
| AOX | alternatív oxidáz |
| BioEdit | biológiai szekvencia szerkesztő és elemző szoftver (“Sequence Alignment Editor”) |
| BSA | szarvasmarha szérum albumin (“Bovine Serum Albumin”) |
| bZIP | bázikus leucin cipzár (“basic Leucin Zipper”) |
| CAT | kataláz |
| Cq | kvantifikációs ciklus (“quantification cycle”) |
| Cu/ZnSOD | réz/cink tartalmú szuperoxid dizmutáz |
| DCM | sejtek víztartalom nélküli tömege (“Dry Cell Mass”) |
| DEG | differentiáltan expresszált gének |
| DEPC | dietil-pirokarbonát (“diethyl pyrocarbonate”) |
| DESeq2 | az RStudio csomagja, a szignifikánsan eltérő expressziójú géneket határozza meg |
| DETAPAC | dietilén-triamin-pentaecetsav |
| DFP | deferipron, vaskomplexáló vegyület, thalassemia major esetében használják gyógyszerként |
| edgeR | az RStudio csomagja, a génekhez tartozó RPKM értékeket adja meg |
| EDTA | etilén-diamin-tetraecetsav (“ethylenediaminetetraacetic acid”) |
| ER | endoplazmatikus retikulum |
| Et | etídium |
| featureCounts | a génexpressziós szintek kvantifikálására szolgáló program |
| FeSOD | vastartalmú szuperoxid dizmutáz |
| FSRD | gomba stressz fehérje adatbázis (“Fungal Stress Response Database”) |
| FungiDB | online adatbázis, gombafajok genomikai, transzkriptomikai és funkcionális adatait tartalmazza |
| GM-CSF | granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor |
| GPx | glutation peroxidáz |

| | |
|------------------------------|---|
| GR | glutation reduktáz |
| GSH, GSSG | a glutation redukált és oxidált formája |
| HISAT2 | genomillesztő szoftver |
| HOG | nagy ozmolaritású glicerín útvonal (“High Osmolarity Glycerol”) |
| HSP | hősokk-fehérje (“Heat Shock Protein”) |
| KCN | kálium-cianid |
| KEGG | bioinformatikai adatbázis, amely a géneket biológiai útvonalakba rendezi (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”) |
| log ₂ FC | a logaritmusos skálán kifejezett génexpresszió változása (“log ₂ fold change”) |
| MAPK | mitogén-aktivált protein kináz, (“Mitogen-activated protein kinase”) |
| MCL | ortológ géncsoportok azonosítására szolgáló algoritmus (“Markov Cluster Algorithm”) |
| M-CSF | makrofág kolóniastimuláló factor |
| MnSOD | mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz |
| MSB | menadion-nátrium-biszulfit, szuperoxid-aniont generáló ágens |
| NBT | nitro blue tetrazolium-klorid |
| NOX | NADPH oxidáz |
| O ₂ ^{•-} | szuperoxid-anion |
| OrthoMCL v2.0 | online génortológ kereső |
| PAF | <i>Penicillium chrysogenum</i> által termelt gombaellenes fehérje |
| PBMC | a perifériás vér mononukleáris sejtjei |
| PCA | főkomponens-analízis, egy dimenzió csökkentő statisztikai módszer (“Principal Component Analysis”) |
| pcrump | az RStudio csomagja, a PCA analízist hajtja végre |
| RCSB PDB RIA | fehérjék és más biomolekulák 3D szerkezeteit tartalmazó nemzetközi redukív vasasszimiláció |
| ROS | reaktív oxigénformák (“reactive oxygen species”) |
| RPKM | olvasatok száma kilobázisonként és millió illesztett olvasatra normalizálva (“Reads Per Kilobase per Million mapped reads”) |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640 sejttenyésztő tápközeg |
| RT-qPCR | kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció |
| SAM | szekvenálási olvasatok (reads) igazítását tároló szöveges formátum |

| | |
|-------------------|--|
| SHAM | szalicil-hidroxámsav |
| ShinyGO 0.77 | online eszköz, géncsoportok funkcionális annotációjára és dúsulási analízisére |
| SMART | fehérjék funkcionális doménjeinek és moduláris szerkezeti elemeinek azonosítására használják (“Simple Modular Architecture Research Tool”) |
| SOD | szuperoxid dizmutáz |
| TRIzol | fenol-kloroform alapú reagens DNS/RNS izoláláshoz |
| Trx | tioredoxin |
| YPD | élesztőt, peptont és glükózt tartalmazó táptalaj |
| $\Delta\Delta CP$ | relatív kvantifikációs érték RT-qPCR-ben, a célgén és referencia gén Cq-különbsége a kezelt és kontroll minták között |

2. BEVEZETÉS

A fonalas gombák széles körben elterjedtek, mivel képviselőik rendkívül sokféle, akár szélsőséges környezeti feltételekhez képesek alkalmazkodni, és ezen tulajdonságuk megértése igen fontos biotechnológiai, ipari és gyógyászati szempontból a számunkra. Ezek a mikroorganizmusok folyamatosan ki vannak téve különböző stresszhatásoknak, melyekhez túlélésük érdekében összetett védekezési mechanizmusok kialakításával alkalmazkodtak. A szakirodalom szerint korábban már többen is foglalkoztak ezen stresszválaszok vizsgálatával, mind humán patogén vonatkozásban (Brandon és mtsai., 2015; Frealle és mtsai., 2013), mind pedig ipari mikrobiológiai hasznosságot illetően (Munster és mtsai., 2016; van Munster és mtsai., 2014, 2015). Továbbá azt is megállapították, hogy a szekunder metabolit termelést (Montibus és mtsai., 2015) és a sporulációt is befolyásolják a környezeti stresszhatások (Leiter és mtsai., 2016; Shao és mtsai., 2019). A fonalas gombák spórái bárhol ott lehetnek környezetünkben, többek között a feldolgozás előtt álló és már fogyasztásra kész élelmiszereinken is jelen lehetnek. Ez problémát jelent a mindennapokban olyan emberek számára, melyek legyengült immunrendszerrel, krónikus légúti megbetegedéssel, avagy allergiával küzdenek (Dijksterhuis, 2019; Herrera-Mozo és mtsai., 2006).

A mindennapi életünk szempontjából fontos kutatási terület a gombák túlélési stratégiáinak, sejtvédelmi mechanizmusainak vizsgálata. Ezen folyamatok feltérképezésével azonosítani tudjuk azokat a célpontokat, amelyek gombaellenes terápiák és stratégiák kidolgozására használhatók, vagy ipari fejlesztésekre fordíthatók. A munkám központi témája az oxidatív stressz hatásának vizsgálata volt. A témán belül is leginkább az oxidatív stressz elleni védekezés egyik kulcsfontosságú elemének, a mitokondriumban lokalizált mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzim szerepére voltunk kíváncsiak.

A mitokondriumok legfőbb feladata, hogy energiát állítsanak elő a sejtek számára, de emellett számos funkciót látnak el. Szerepük van a metabolikus folyamatok szabályozásában, a reaktív oxigénformák termelésében és eliminálásában, az apoptotikus folyamatok irányításában, a kalcium-homeosztázis szabályozásában, valamint a hőtermelésben is (Sterea és El Hiani, 2020; Vakifahmetoglu-Norberg és mtsai., 2017; Von Bank és mtsai., 2021). Mivel az energiaellátás központjaiként a reaktív oxigénformák (ROS) keletkezésének elsődleges helyei is, kiemelkedő szerepet játszanak a sejtek öregedési folyamataiban. Az ascomycota gombákban, például a *Podospora anserina*, a *Neurospora crassa* és a *Saccharomyces cerevisiae* modellszervezetekben az öregedési folyamatok feltárásával már több tanulmány is foglalkozott, mivel életciklusuk jól nyomon követhető, továbbá genetikai

módosításuk viszonylag egyszerű kivitelezhetősége lehetővé teszi a mitokondriális folyamatok többszintű elemzését (Scheckhuber és mtsai., 2008, 2009). A mitokondriumok működése hatékonyságának romlása az öregedés egyik fő kiváltó tényezője (Cui és mtsai., 2011). Az öregedéssel fokozódó oxidatív stressz a fehérjeminőség-ellenőrzési rendszerek meghibásodásához vezet, amelynek következtében a hibás fehérjék felhalmozódnak a mitokondriumokban (Cui és mtsai., 2011; Osiewacz, 2002).

A mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) egy evolúciósan ősi metalloenzim, amely alapvető szerepet játszik a mitokondriumok integritásának és funkcióinak fenntartásában (Weisiger és Fridovich, 1973). Ennek hiánya vagy túlzott expressziója jelentős hatással van a sejtek élettartamára. Míg hiánya rövidíti az élettartamot a fokozott oxidatív károsodás miatt, a túlzott mennyisége is káros, mivel felborítja a fehérjeminőség-ellenőrző rendszerek működését, csökkenti más antioxidáns mechanizmusok, például a glutation (GSH) és a peroxidázok hatékonyságát és az általa előállított megnövekedett mennyiségű H_2O_2 károsíthatja a mitokondriális funkciókat (Scheckhuber és mtsai., 2009; Zintel és mtsai., 2010).

Egy gén szerepének feltérképezésére az egyik leghatékonyabb módszer az, ha a gént eltávolítjuk a genomból. Az így bekövetkező változásokat vizsgálva átfogó képet kaphatunk az adott gén funkciójáról. Ezért kísérleteinkbe bevontuk az *A.nidulans* és az *A. fumigatus* olyan deléciós mutánsait is, melyekben korábban homológ rekombinációval kiütötték a mitokondriális MnSOD enzim génjét. Az *A. nidulans* deléciós mutánsáról megállapították, hogy a *MnSOD/sodB* gén hiányában a mutáns törzs az oxidatív stresszre meglehetősen érzékeny, továbbá az apoptotikus sejthalál mértéke is fokozódott. A SodB hiánya számos alapvető fiziológiai folyamatot befolyásolt, mint az antioxidáns enzimek és szekunder metabolitok, köztük a szterigmatocisztin termelését, a légzést, valamint a spóráképződést és a spórák stressztűrését. A *sodB* gén deléciójának hatása tovább fokozódott glükózmentes tápközegben, ahol a mutáns törzs növekedésében jelentős zavarokat tapasztaltak (Leiter és mtsai., 2016).

Az *A. fumigatus*-ban ugyanezen gén ortológjának deléciója (*sod2*) szintén több jelentős változást eredményezett. A mutáns törzs 45 °C-on csökkent növekedést és menadion-nátrium-biszulfittal (MSB, szuperoxidot generáló ágens, K₃-vitamin vízdoldékony alakított formája) szemben fokozott érzékenységet mutatott. Érdekes módon, bár a mutáns törzs érzékenyebb volt az oxidatív stresszre, virulenciája immunhiányos egerekben nem mutatott szignifikáns csökkenést a vad típushoz képest (Lambou és mtsai., 2010).

PhD munkámban ezeken az eredményeken túlmenően a *sodB/sod2* deléció által kiváltott transzkriptom szintű változásokat vizsgáltuk *A. nidulans* és *A. fumigatus* törzseken. A

kísérleteinkben oxidatív stressz mentes és stressznek (MSB) kitett micéliumokból izolált RNS mintákat szekvenáltattunk és kerestük a két faj közötti oxidatív stresszre adott válaszok különbségeit és az *A. fumigatus* esetében megoldásokat az ellene való védekezésre.

3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az *Aspergillus nidulans* és az *Aspergillus fumigatus* a kutatásokban

Az *A. nidulans* igen széleskörben használt modellszervezet a biológiai, genetikai és ipari kutatásokban (Martinelli, 1994). Ennek oka, hogy könnyen tenyészthető, jól jellemezhető genetikai rendszere van, és számos olyan tulajdonsága, amelyek alkalmassá teszik a különböző tudományos vizsgálatokra. Filogenetikailag az *Aspergillus* nemzetség egyik legismertebb tagja, amely különösen fontos a fonalas gombák növekedési és fejlődési mechanizmusainak, sejtciklusának, valamint a másodlagos anyagcseréjének tanulmányozásában.

Képes az ipar szempontjából jelentős anyagok termelésére, fehérjék és enzimek, többek között cellulázok, β -glükozidázok, hemicellulázok, lipázok, proteázok előállítására, ezáltal hozzájárul ipari törzsek biotechnológiai fejlesztéséhez (Ghazawi és mtsai., 2023; Kumar, 2020; Ntana és mtsai., 2020). Továbbá toxintermelési vizsgálatokba is bevonható, ahol a toxintermeléssel kapcsolatos génexpressziós hálózatok és a szekunder anyagcsere szabályozásának mélyebb megértése zajlik, mivel természetes körülmények között szterigmatocisztint termel, amely az aflatoxin bioszintézis egyik fontos köztiterméke (Keller és mtsai., 2007; Kim és mtsai., 2017; Mahata és mtsai., 2022).

Genomja feltárt és elérhető, mely lehetővé tette a részletes genetikai vizsgálatokat (Aspergillus Genome Projects, Broad Institute, 2003). Továbbá génjeinek jelentős részét is azonosították és jellemezték, mely információk elérhetőek voltak éveken át az *Aspergillus* kutatói közösség számára az *Aspergillus* Genome Database (AspGD, <https://ngdc.cnbc.ac.cn/databasecommons/>) weboldalon keresztül. Az egyik legfrissebb tanulmányban pedig az *A. nidulans*-hoz közel álló 25 fajt (*Nidulantes* filogenetikai csoport) szekvenáltak meg és mint referencia fajjal, összehasonlító elemzéseket végeztek vele, így tovább erősítve az *A. nidulans*, mint modellszervezet fontosságát (Theobald és mtsai., 2025).

Az *A. fumigatus* egy igen elterjedt szaprotróf fonalas gomba, amely elsősorban lebomló szerves anyagokon, talajban, komposztban és egyéb növényi maradványokon fordul elő. Hőmérséklet-toleranciája kiemelkedő, mivel akár 50 °C feletti hőmérsékleten is képes

növekedni, így különösen jól alkalmazkodott a komposztálódó növényi anyagok lebontásához (Altenburger és mtsai., 2014; Bhabhra és Askew, 2005). Spórái (konídiumai) könnyen terjednek a levegőben, és folyamatosan jelen vannak a környezetben, beleértve a beltéri levegőt is (Taha és mtsai., 2005) .

Bár az *A. fumigatus* alapvetően szaprotróf, opportunistá patogén is lehet. Egészséges immunrendszerű emberek számára általában nem okoz problémát, azonban immunhiányos betegekben súlyos aspergillózist okozhat, amely tüdőfertőzésként vagy invazív aspergillózisként is jelentkezhet. Különösen veszélyeztetettek a szervátültetésen átesett betegek, kemoterápiában részesülők és HIV/AIDS-ben szenvedők, mivel legyengült immunrendszerük nem képes hatékonyan megsemmisíteni a belélegzett spórákat (Dagenais és Keller, 2009; Oberle és mtsai., 2015; Paulussen és mtsai., 2017).

Élelmiszer-biztonsági szempontból az *A. fumigatus* jelentősége kisebb, mint az *Aspergillus flavus*-é, vagy az *Aspergillus parasiticus*-é, amelyek közismert mikotoxin termelők és igen nagy problémát okoznak az élelmiszeriparra nézve (Leyva Salas és mtsai., 2017). Ennek ellenére egyes tanulmányok kimutatták, hogy jelen lehet gabonaféléken, áprán, rizsen, búzán, továbbá dióféléken, mogyorón, dión, földimogyorón (Paterson és Lima, 2017). Bár az *A. fumigatus* a gliotoxin termelésével nem okoz akkora toxikológiai problémát, spórái jelenléte az immunhiányos emberek számára kockázatot jelenthet, mivel az élelmiszerekben előforduló spórák kezelési vagy előkészítési folyamatokban a levegőbe kerülhetnek, így belélegezhetők, illetve fogyasztás útján is bekerülhetnek a szervezetbe.

A gomba egyik legfontosabb szekunder metabolitja a gliotoxin, amely egy immun-suppresszív és citotoxikus hatású vegyület. A gliotoxin gátolja a makrofágokat és az immunrendszer egyéb résztvevőinek működését gátolva a NF- κ B jelátvitelt, ezáltal segítve az *A. fumigatus* túlélését az emberi szervezetben (Lalgé, 2001; Lewis és mtsai., 2005; Tomee és Kauffman, 2000). A toxin jelenléte megteremti a kedvező környezeti feltételeket a biofilm kialakulásához a tüdő kolonizációja közben lehetővé téve az *A. fumigatus* számára a hatékony megtapadást. Ez problémát jelent az immunhiányos egyéneknél, mivel a biofilm jelenléte megnehezíti a fertőzés kezelését és növeli a súlyos aspergillózis kockázatát (Bugli és mtsai., 2014). Ezen kívül ROS termeléssel indukál sejtkárosodást az immunsejtekben, és hozzájárul az invazív aspergillózis patogeneziséhez (Ye és mtsai., 2021).

3.2. Az oxidatív stressz

Az oxidatív stressz minden aerob élőlényt érintő stresszforma, ami akkor jelentkezik, amikor a sejtek túlzott mértékben termelnek ROS-t, vagy amikor az antioxidáns rendszereik

már nem képesek megfelelően semlegesíteni ezeket (Lushchak, 2014). Az aerob anyagcserében a felhasznált oxigén nagy része vízzé alakul az elektrontranszport lánc citokróm oxidáz enzimkomplexe által, miközben reaktív oxigénformák nem jelennek meg (Sigler és mtsai., 1999). Az elektrontranszport lánc az oxidatív foszforilációval kapcsolódva energiát termel, mely ATP formájában tárolódik (Stromájer-Rácz, 2013). Prokariótákban az elektrontranszport lánc a plazmamembránban, míg eukariótákban a mitokondrium belső membránjában található (Lushchak, 2011).

Az oxigén kb. 10%-a azonban melléktermékként káros ROS-á alakulhat az elektrontranszport alatt (Vertuani és mtsai., 2005). A mitokondriumok az eukarióta sejtekben a ROS fő termelői, ahol az elektronok szivárgása az elektrontranszport láncból szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) képződéséhez vezet (Dickinson és Chang, 2011). Ezek a gyökök további reakcióban hidrogén-peroxiddá (H_2O_2), és hidroxilgyökké ($\cdot OH$) alakulhatnak, amelyek károsíthatják a DNS-t, fehérjéket és lipideket (Benzie, 2000). Szoros összefüggés van a fémion homeosztázis és oxidatív stressz kialakulása között, mivel $\cdot OH$ a Fenton és a Haber-Weiss reakciókban keletkeznek úgy, hogy az Fe^{2+} (ferro) ionok redukálják a hidrogén-peroxidot, miközben Fe^{3+} (ferri) ionok és hidroxilgyökök keletkeznek (Halliwell és Gutteridge, 2015). Az Fe^{3+} iont végül a $O_2^{\cdot-}$ alakítja vissza Fe^{2+} ionná.

ROS nemcsak a mitokondriumokban, hanem az endoplazmatikus retikulumban (ER), a sejtmembránon és a sejtmag membránján is keletkezhet (Lushchak, 2014). Az ER-ben a citokróm P450 enzimekhez kapcsolódó hidroxilációs folyamatokban is képződhetnek ROS-ok. Továbbá különböző oxidázok, oxigenázok és dehidrogenázok (pl. xantin oxidáz, glioxál oxidáz és a NADPH oxidáz (NOX) is hozzájárulnak a ROS termeléséhez (Aung-Htut és mtsai., 2011; Chaudière és Ferrari-Iliou, 1999; Dores és mtsai., 1990; Tan és mtsai., 2009; Temple és mtsai., 2005).

3.3. Az oxidatív stressz elleni védekezés

A gombák oxidatív stressz elleni védekezési mechanizmusai összetett rendszereken alapulnak, amelyek lehetővé teszik számukra a túlélést és alkalmazkodást változó környezeti feltételekhez. A gombák számára az oxidatív stressz kezelése különösen fontos, hiszen a természetes környezetben számos ilyen stresszhatás érheti őket, továbbá a gazdaszervezet immunrendszere is gyakran oxidatív stresszt idéz elő a patogén gombákban (Dantas és mtsai., 2015).

A gombák antioxidáns védelmi rendszere több szinten működik a ROS semlegesítésére és az oxidatív károsodások minimalizálására. Az oxidatív stressz elleni védekezés első szintjét a szenzorok és jelátviteli útvonalak jelentik, amelyek érzékelik a ROS jelenlétét, és aktiválják a megfelelő válaszokat. Három fő útvonal ismert, amelyek kulcsfontosságú szereplők ebben a folyamatban: a HOG (nagy ozmolaritású glicerin, “high osmolarity glycerol”) útvonal, a Yap1 (“yeast-aktivátor protein 1”) -függő útvonal, valamint a Skn7 (válasz szabályozó, “response regulator”) által szabályozott mechanizmusok (Bruder Nascimento és mtsai., 2016; He és mtsai., 2005; Lessing és mtsai., 2007; Mulford és Fassler, 2011; Nikolaou és mtsai., 2009). A HOG-útvonalban kulcsfontosságú szerepet játszik a Hog1 nevű mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), amely a gombafajoknál általánosan megfigyelhető konzervatív enzim és alapvető szerepet tölt be nemcsak az ozmotikus stressz elleni védelemben, hanem az oxidatív stresszre adott válaszban is (Bruder Nascimento és mtsai., 2016; Lara-Rojas és mtsai., 2011). A Yap1 oxidatív stressz jelenlétében aktiválja a szuperoxid dizmutázok (SOD), a katalázok és peroxidázok génjeit, míg az Skn7 transzkripciós faktorok a DNS-javítás, sejtfal-bioszintézis és antioxidáns enzimek szabályozásában fontosak (He és mtsai., 2005; Mulford és Fassler, 2011). Fontos még megemlíteni további stresszválasz szabályzó bázikus leucin cipzár (bZIP) típusú transzkripciós faktorokat, melyek funkcióinak felderítésével korábban Tanszékünk munkatársai foglalkoztak. Az AtfA/Atf1 transzkripciós faktor ortológok *A. nidulans*-ban és *Fusarium verticillioides*-ben az oxidatív stressz elleni védelem mellett számos más feladatot is ellátnak, mint a nyugvó konídiumok védelme, valamint a patogenezis elősegítése és szekunder metabolitok termelésének szabályozása (Kocsis és mtsai., 2022; Szabó és mtsai., 2020)

A védekezés egyik legfontosabb eleme a sejtek antioxidáns rendszereinek aktiválása, amelynek elemei lehet enzimátikusak vagy nem enzimátikusak. Az antioxidáns enzimek közé tartozik a SOD, kataláz (CAT), glutation peroxidáz (GPx), tioredoxin (Trx) és a glutation reduktáz (GR), amelyek közvetlenül részt vesznek a ROS semlegesítésében (Benzie, 2000; Lushchak, 2014). Ezeken kívül vannak nem enzimátikus antioxidáns molekulák is, mint például a glutation (GSH), flavonoidok és poliaminok, amelyek szintén hozzájárulnak a sejtek redox-homeosztázisának fenntartásához. Az oxidatív stressz alatt a gombák fokozott NADPH-termeléssel is reagálnak, amely az antioxidáns rendszerek működéséhez szükséges. (Belozerskaya és Gessler, 2007; Yaakoub és mtsai., 2022)

A sejtek oxidatív stresszhez való alkalmazkodásakor nemcsak az antioxidáns védelem fokozódik, hanem a DNS-javító mechanizmusok és a fehérjebontó rendszerek is aktiválódnak. Az oxidatív stressz károsíthatja a DNS-t, fehérjéket és lipideket, így a gombák különféle

hősokk-fehérjéket (HSP-k), ubiquitin-függő lebontó rendszereket és DNS-javító enzimeket használnak a károsodások helyreállítására. A sejt regenerációs folyamatai így szorosan összefüggnek az oxidatív stressz elleni védekezéssel (Gasch, 2003; Toledano és mtsai., 2003).

Súlyos oxidatív stressz alatt a gombák lelassíthatják növekedésüket, vagy akár teljesen fel is függeszthetik a sejtosztódást (Gasch, 2003; Toledano és mtsai., 2003). Ez egy energia- és anyagtakarékossági mechanizmus, amely lehetővé teszi, hogy a sejtek az oxidatív stressz leküzdésére összpontosítsanak. A csökkent növekedés együtt járhat a sejtciklus-gének, a riboszóma-bioszintézis gének és a DNS-replikációhoz szükséges mechanizmusok gátlásával, amelyek mind hozzájárulnak ahhoz, hogy a sejtek elkerüljék a stressz miatt fellépő hibás sejtműködés következményeit (Gasch, 2003).

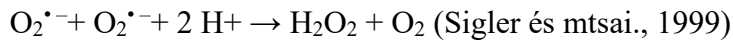
Érdekes módon az oxidatív stresszválasz szoros kapcsolatban állhat a szekunder metabolitok termelésével (Montibus és mtsai., 2015). Egyes mikotoxinok, például az aflatoxinok, ochratoxinok és trichotecének termelését oxidatív stressz indukálhatja, míg antioxidánsok jelenlétében ezek a folyamatok visszaszorulnak. Feltételezések szerint egyes gombák esetében a szekunder metabolitok termelése a sejtek redox-egyensúlyának fenntartásában is szerepet játszhatnak, míg más esetekben ezek a vegyületek kompetitív előnyt biztosíthatnak más mikroorganizmusokkal szemben, például a gazdaszervezet immunrendszere vagy más gombafajok elleni védekezésként (Linz és mtsai., 2013; Montibus és mtsai., 2015).

3.4. A SOD enzimek

A szuperoxid dizmutázok (SOD) az oxidatív stressz elleni védelem résztvevői, feladatuk a szuperoxid-anionok eliminálása. A SOD-ok metalloenzimek, melyek attól függően, hogy milyen fémion található a szerkezetükben, több csoportba oszthatók. A legősibb típusú a vastartalmú SOD (FeSOD), mely baktériumokban, archeákban és eukariótákban, például növényekben is megtalálhatóak (Almansa és mtsai., 1991). A mangántartalmú SOD (MnSOD) az FeSOD-dal igen nagy szekvenciahomológiát mutat, így valószínűleg közös evolúciós eredetűek (Case, 2017; Jackson és Cooper, 1998). Megtalálható széles körben archeákban és eukariótákban, leginkább a mitokondriális mátrixban, de a növények kloroplasztiszában is kimutatták már. A réz/cink SOD (Cu/ZnSOD) enzimeket az eukarióta sejtek citoszoljában, a növényi peroxiszómákban és a lizoszómákban figyelték meg. A főemlősöknél pedig a citoszolban az MnSOD és a Cu/ZnSOD is jelen lehet egyidejűleg (Case, 2017; Fukai és Ushio-Fukai, 2011). Továbbá még megkülönböztetünk nikkel tartalmú SOD-

ot (NiSOD) is, amely főként tengeri fajokban és bizonyos baktériumokban fordul elő, és szerkezetileg is eltér a többi SOD típustól, ami konvergens evolúcióra utal (Case, 2017). Az antioxidáns enzimek közül a SOD katalizálja a szuperoxid-anionok hidrogén-peroxiddá és oxigénné történő átalakítását (Valle és mtsai., 2022), majd a kataláz a hidrogén-peroxidot lebontja vízzé és oxigénné, így elhárítva a veszélyes gyökök felszaporodását (Vertuani és mtsai., 2005).

A SOD által katalizált reakció egyenlete:



A képződött H_2O_2 eliminálása két úton valósulhat meg:

- Kataláz által: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- Glutation-függő peroxidáz által: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ (Stromájer-Rácz, 2013)

Ebben a munkában az MnSOD enzimre fókuszáltunk a SOD enzimek közül, ennek deléciójával már korábbi vizsgálatokban is foglalkoztak több modellorganizmusban, és kimutatták, hogy hiánya jelentős hatást gyakorol a gomba fiziológiájára. Az MnSOD deléciónak hatása a különböző gombafajok transzkriptomjában eltérő, azonban néhány közös jellemző is megfigyelhető.

3.4.1. Az MnSOD enzim különböző fajokban

A *S. cerevisiae* élesztőgombában széleskörűen vizsgálták a SOD enzimek funkcióit. A *POS5* gén (mely a mitokondriális NADH kinázt kódolja), a *SOD1* gén (a citoplazmatikus Cu/ZnSOD-t kódoló gén) és a *SOD2* gén (az MnSOD-ot kódoló gén) deléciója hasonló transzkripciós változásokat idézett elő. Ezek a változások érintették az aminosav- és szénhidrát-anyagcserét, az RNS- és DNS-anyagcserét, a transzportfolyamatokat, a fehérjék hajtogatódását, valamint az oxidatív stresszre adott válaszokat (Stuart és mtsai., 2009). Megfigyeltük továbbá, hogy a *POS5* gén hiánymutánsánál a hypoxiás vagy az anaerob növekedéssel kapcsolatos gének felülszabályozódását tapasztalták (Stuart és mtsai., 2009). Ez arra utalhat, hogy a sejtek főként a mitokondriális aktivitás megváltozására reagálnak, és nem közvetlenül a sejten belüli ROS koncentrációjának növekedésére. A legújabb kutatások szerint a *Saccharomyces cerevisiae* sejtek oxidatív stressz hatására, például paraquat-expozíció alatt, genetikai mechanizmus révén képesek leállítani a légzési folyamataikat. Ez folyamat a mitokondriális oxidatív foszforilációs gének delécióján keresztül történik, amelyet a retrográd jelátviteli útvonal aktiválása közvetít. Ebben a következőknek van fontos szerepe: a mitokondriális szuperoxid dizmutáz 2 (SOD2) enzimnek, valamint az Rtg2-nek

(citoplazmatikus érzékelő fehérje) és az Rtg3-nak (sejtmagi transzkripciós faktor), amelyek a mitokondrium és a sejtmag közötti kommunikációt szabályozzák (Stenberg és mtsai., 2022).

A biológiai öregedés egyik legismertebb modellorganizmusában, a *Podospora anserina*-ban is vizsgálták az MnSOD génjét korábbi kutatásokban. Megállapították, hogy a *Pasod3* gén deléciója az élettartamra nem volt hatással. A gén hiányában több probléma is jelentkezett a sejtekben, többek között megnövekedett a szuperoxid-anionok szinte és az I-es komplex köthető légzési folyamatok károsodtak, de ezt kompenzálni tudták a sejtek az autofágia aktiválásával, különösen a mitofágián keresztül. Másik igen fontos megfigyelésük az volt, hogy a gén deléciója globális transzkripciós választ váltott ki, ami több gén felülszabályozódását okozta. A mitokondriális biogenezisben, a légzési folyamatokban és az anyagcserében részt vevő gének transzkripciójában történtek ezek a változások (Knuppertz és mtsai., 2017). Ebből az látszik, hogy a mitokondriumok károsodására bekövetkező válaszok segítik a sejtek túlélését, miközben a fő cél a mitokondriális funkciók helyreállítása. A *PaSod3* hiányában a sejtek adaptív mechanizmusokkal kompenzálják az oxidatív stressz és a légzéskárosodás okozta hátrányokat, különös tekintettel a mitokondriális gének fokozott expressziójára és a mitokondriális anyagcsere hatékonyabb szabályozására (Knuppertz és mtsai., 2017).

Ezekből a korábbi kísérletekből arra lehet következtetni, hogy mind a *S. cerevisiae*-ben és mind a *P. anserina*-ban a mitokondriális funkciók és az oxidatív stressz között szoros kapcsolat van. Ebből a tanulmányokból láthatjuk, hogy a gombák igen komplex szabályozási rendszeren keresztül védekeznek az oxidatív stressz ellen. Az oxidatív stresszel összeköthető betegségek tanulmányozását és az öregedés molekuláris mechanizmusának megértését is előlendíthetik az ilyesfajta vizsgálatok. Továbbá új terápiás eszközök fejlesztésére fordítható ismeretekre is szert tehetünk, melyek a mitokondriumok működésére és azok stresszválaszára irányulnak.

3.4.2. Az MnSOD-ok az *Aspergillus* nemzetségben

A *sodB* gén ortológjai megtalálhatóak az *Aspergillus* nemzetség tagjaiban is és funkcionális jellemzésükkel több munka is foglalkozott már. Az aflatoxintermelő *Aspergillus flavus*-ban az *mnSOD* gén ortológjának deléciója lassú növekedési fenotípust idézett elő minden vizsgált tenyésztési körülmény között és negatívan befolyásolta az aflatoxin B1 termelést (Reverberi és mtsai., 2013).

Az *A. nidulans*-ban az *mnSOD/sodB* gén hiánya több jelentős változást eredményezett a törzs fenotípusában. A gén deléciója fokozott érzékenységet váltott ki menadionnal és PAF-

fal (a *Penicillium chrysogenum* által termelt gombaellenes fehérje, amely apoptotikus sejthalált idéz elő az érzékeny gombákban) szemben. Ezenkívül megnövekedett intracelluláris glutation-reduktáz és kataláz aktivitást figyeltek meg az exponenciális növekedési fázisban lévő kultúrákban, valamint megnövekedett szterigmatocisztin termelést az éhező kultúrákban (Leiter és mtsai., 2016). A légzésre gyakorolt hatásokat illetően csökkent a KCN-érzékeny citokróm c-függő légzés, valamint az AOX-függő alternatív légzés. Ezzel szemben növekedett a KCN + SHAM (szalicil-hidroxamát, amely blokkolja az alternatív oxidázt) rezisztens, úgynevezett reziduális légzés a szénhiányos kultúrákban. Ugyanakkor a KCN + SHAM rezisztens légzés csökkent glükózzal kiegészített táptalajon növekvő tenyészetekben (Leiter és mtsai., 2016). A *sodB* deléciója csökkentette a konídiumok termelését, továbbá rontotta a konídiumok hőtűrését (50 °C) és életképességét, amikor azokat 4 °C-on tárolták (Leiter és mtsai., 2016). A mutáns és vad típusú törzsek növekedési mintázata között is jelentős különbségeket figyeltek meg. Friss, glükózzal kiegészített táptalajon a deléciós törzs növekedése 4 órás inkubációs idő esetén lassabb volt a vad típuséhoz képest, azonban ez a késleltetett növekedési fenotípus eltűnt, amikor az inkubációs időt 10 órára növelték (Leiter és mtsai., 2016).

Az *A. fumigatus* esetében pedig azt mutatták ki korábbi munkákban, hogy a *sod2* gén erősen expresszálódik a konídiumokban és a növekvő micéliumban, különösen a tenyésztés későbbi szakaszaiban, továbbá menadion- és hőkezelések hatására nő az expressziója (Lambou és mtsai., 2010). A Δ *sod2* mutáns törzsek megnövekedett menadion- és hőérzékenységet mutattak, ami megerősíti az MnSOD-ok szerepét a stressztűrésben. Fontos eredmények közé tartozik ezen faj esetében az a megfigyelés, hogy a vas-homeosztázisának bármilyen zavara – legyen szó akár vas-korlátozásról, akár vas-többletről – a mitokondriális és egyéb sejtfunciók zavarához vezethet (Long és mtsai., 2016). A mitokondriális vas-kén klaszter összeszereléséért felelős klaszterek kiemelten fontosak a vasérzékelés szempontjából, és ezek működésének gátlása vaséhezési válaszokat vált ki (Misslinger és mtsai., 2018). Különösen érdekes megfigyelés, hogy a redukzív vasasszimilációs (RIA) és a sziderofórmediált vasszerzési útvonalak genetikai modulálása gyakran növeli az intracelluláris ROS koncentrációját, ami oxidatív stresszre érzékeny fenotípusok kialakulásához vezethet (Blatzer és mtsai., 2011; Brandon és mtsai., 2015; Schrettl és mtsai., 2007, 2008; Schrettl és Haas, 2011). A vasfelvételi rendszerek és az antioxidáns védelmi mechanizmusok célzott befolyásolása gyógyszerekkel vagy gyógyszerjelölt molekulákkal eddig ígéretes eredményeket mutatott, amivel érdemes foglalkozni további kutatásokban a jövőben (Leal és

mtsai., 2012, 2013; Yaakov és mtsai., 2017). Ez a terület az oxidatív stresszre érzékeny patogén gombák elleni terápiás stratégiák kidolgozásában is jelentős lehetőségeket rejt.

Összefoglalva, a gombák MnSOD enzimjei alapvető szerepet töltenek be a konídiumok és vegetatív micéliumok fenntartásában, a környezeti stressz elleni védekezésben, és fajspecifikusan befolyásolhatják az *Aspergillus* fajok mikotoxin-termelését.

3.5. A menadion nátrium-biszulfit (MSB)

A menadion-nátrium-biszulfit vagy MSB egy vízoldható vegyület, amely a K-vitaminok csoportjába tartozik, és szintetikus K₃-vitaminként is ismert. Kémiaiilag az MSB a menadion (2-metil-1,4-naftokinon) vízoldékony és stabilabb formája, amelynek a képlete: C₁₁H₁₁NaO₅S.

Biológiai hatásait tekintve az MSB erőteljes oxidatív stresszt indukál a sejtekben, mivel elősegíti a ROS, ezen belül a O₂^{*} - képződését. Ezt a tulajdonságot kihasználva az MSB-t rákellenes szerként is vizsgálják, leginkább a kemoterápiás kezelések mellé szinergista szerként. (Parekh és mtsai., 1991).

Az MSB-t széles körben alkalmazzák mikrobiológiai és sejtteni kutatásokban az oxidatív stressz kiváltására és annak sejtszintű hatásainak vizsgálatára. Állatkísérletekben és humán kutatásokban egyaránt felhasználják a K-vitaminok biológiai szerepének feltárására, továbbá biotechnológiai alkalmazásokban antioxidáns vagy pro-oxidáns hatások tesztelésére.

3.6. Deferipron és vashiányos környezet

Korábban Tanszékünkön megállapították, hogy a vas- és a szénéhezés kombinációja felerősíti az *A. fumigatus* oxidatív stresszel szembeni érzékenységet (Emri és mtsai., 2024). Így szerettük volna megvizsgálni azt is, hogy mi történik, ha a vashiányt kombináljuk az MSB jelenlétével. A vashiányos környezetet deferipron (DFP) táptalajhoz adásával valósítottuk meg. A DFP egy vaskelátor, amelyet a thalassémia major esetén kialakuló vasfelhalmozódás csökkentésére alkalmazzák (Berdoukas és mtsai., 2012). Képes eltávolítani a vasat a transferrinből és laktoferrinből, továbbá bejutni az emlős sejtekbe, sőt, még a mitokondriumokba is, ahol Fe³⁺-komplexeket képezhet (Glickstein és mtsai., 2005; Kontoghiorghes, 2023). A DFP, mint a legtöbb vaskelátor nemcsak az Fe³⁺ megkötésére képes, a Cu²⁺ vagy Zn²⁺ ionok toxicitásának a csökkentésére is alkalmas (Kontoghiorghes, 2023). A DFP gátolta az *A. fumigatus* biofilmet képző kultúráinak vagy már kialakult biofilmjeinek metabolikus aktivitását (Nazik és mtsai., 2015; Sass és mtsai., 2019). A transzkriptomikai és fiziológiai kísérletekben a DFP kezelés vas éhezési stresszválaszt vált ki

az *A. fumigatus*-ban anélkül, hogy befolyásolná a ROS termelést vagy a réz homeosztázist, viszont a Zn²⁺ transzporter gének expressziójára hatással van (Emri és mtsai., 2024).

4. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám célja az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* MnSOD enzimjének összehasonlító funkcionális jellemzése volt, különös tekintettel az enzimeknek az oxidatív stressz elleni védelemben betöltött szerepére. Az *A. nidulans* kiváló modellszervezet, amely a jól jellemezett genomjának és az azonosított génjeinek köszönhetően transzkriptomikai munkákban megbízhatóan alkalmazható és jól felhasználható új génfunkciók és gének közötti kapcsolatok megállapítására. Összevetve az *A. fumigatus* transzkriptomával a két fonalgomba közötti különbségek jobban azonosíthatóvá váltak. Vizsgálatunkkal lehetőség nyílt arra, hogy a két fonalas, spóráképző és szekunder metabolitokat termelő gomba oxidatív stresszválaszát mélyebben megértsük, mely képességek feltárása gyógyászati és ipari szempontból is fontos lehet. Az *A. fumigatus*, mint opportunistá humánpatogén, különös jelentőségű klinikai szempontból. Transzkriptomikai adatainak az összehasonlítása az *A. nidulans*-ban található ortológok expressziós mintázatával hozzájárulhat az oxidatív stresszvédelem evolúciós és funkcionális különbségeinek feltárásához.

Munkánkban a következő lépések végrehajtását tűztük ki:

1. Folyékony tápoldatban normál és oxidatív stressznek kitett körülmények közötti tenyésztés, ebből RNS izolálás, szuperoxid szint és SOD aktivitás mérés. Szilárd táptalajon az oxidatív stressz érzékenységnek az összehasonlítása.
2. Az RNS szekvenálásból származó adatok kiértékelése, a differenciálisan expresszálódó gének meghatározása, géncsoportok génkészlet-dúsulási elemzéseinek végrehajtása.
3. qPCR-rel az eredmények validálása a transzkriptomikai adatokból kiválasztott génekkel.
4. A kapott eredmények fényében további munkák elvégzése (pl. makrofágokkal szembeni érzékenység vizsgálat).

Munkánkban az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

MnSOD enzimek élettani szerepe:

1. Milyen szerepet játszanak az *A. nidulans* és *A. fumigatus* mitokondriális MnSOD enzimek az oxidatív stressz elleni védelemben?

sodB és *sod2* gén deléció hatásai:

2. Milyen mértékben növeli az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* gén deléciója a gombák oxidatív stresszérzékenységet?

Alternatív védekezési mechanizmusok:

3. Milyen antioxidáns enzimek aktiválódnak az MnSOD hiányának kompenzálására?

A. nidulans és *A. fumigatus* eltérő stresszválaszai:

4. Milyen különbségek tárulnak fel az összehasonlító funkcióanalízis révén a két törzs stresszválaszában?

5. Az *A. fumigatus*-specifikus különbségek vajon miképpen használhatók majd ki a jövőben a gyógyszerfejlesztésekben?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A két *Aspergillus* faj mangán SOD génjének összehasonlítása

Az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* génjeinek esetében elvégeztük a nukleotid- és aminosav-szekvenciák összehasonlítását. A szekvenciák a FungiDB adatbázisból származtak (*A. nidulans* esetében: <https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/AN5577#Sequences>, *A. fumigatus* esetében: https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/AFUB_068610#Sequences). Az intron- és UTR-régiókat is a FungiDB alapján azonosítottuk.

A szekvenciák összehasonlítása a BioEdit programmal történt (<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>). Az aminosav-szekvenciák közötti homológia meghatározását az NCBI BLAST program segítségével végeztük el (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Továbbá a két fehérje térszerkezetét is összehasonlítottuk prediktált 3D-s modellek alapján. Az AlphaFold 2 online programmal (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) generáltuk a SodB és Sod2 fehérjék előrejelzett szerkezeti modelljeit, amelyeket ezt követően az RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) felületén illesztettük egymásra.

Ezenkívül funkcionális domének meghatározását is elvégeztük a SMART szoftver ("Simple Modular Architecture Research Tool") (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) online felületén, amely a már ismert domének alapján végez homológiaalapú keresést a fehérjeszekvencia alapján.

5.2. A kísérletekben felhasznált törzsek és tenyésztésük

1. táblázat: A kísérletekben felhasznált törzsek. ¹

Aspergillus nidulans törzsek:

| Azonosító | Genotípus | Eredet |
|---------------|---|--------------------------|
| THS30.3 | pyrG89, AfupyrG+; pyroA+; veA+ | (Emri és mtsai., 2015) |
| $\Delta sodB$ | pyrG89, AfupyrG+; pyroA+; veA+; $\Delta sodB$ | (Leiter és mtsai., 2016) |

Aspergillus fumigatus törzsek:

| Azonosító | Genotípus | Eredet |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|
| $akuB^{ku80}$ | $\Delta KU80$ | (Lambou és mtsai., 2010) |
| $\Delta sod2/IP345$ | $\Delta KU80$; $\Delta sod2$ | (Lambou és mtsai., 2010) |

Az *A. fumigatus* $akuB^{ku80}$ törzsben a *ku80* gén került kiütésre, amely a nem-homológ végösszekapcsolás útvonal (“non-homologous end joining”) kulcsgénje. A gén kiütésével megnőtt a homológ rekombináció hatékonysága ebben a törzsben, ezáltal könnyebb genetikai módosításokat végrehajtani rajta. Mindkét mutáns törzset a *sodB* és a *sod2* génekre tervezett deléciós kazettával, homológ rekombinációval állították elő. A kiütött szekvencia helyére a hygromycin rezisztencia gén került szelekciós markerként. A törzseket Barratt-féle nitrát tartalmú minimál táptalajon (AMM) tartottuk fent (Barratt és mtsai., 1965) és spóráztattuk kísérleteinkhez. A táptalaj összetevői 1 literre vonatkoztatva: 6 g NaNO₃; 1,52 g KH₂PO₄; 0,52 g MgSO₄·4H₂O; 0,52 g KCl; 10 g glükóz; 20 g agar (pH 6,5), továbbá 1 ml nyomelemoldat. Ennek összetétele 1 literre vonatkoztatva: 22 g ZnSO₄·7 H₂O; 5 g FeSO₄·7 H₂O; 5 g MnCl₂·4 H₂O; 1,6 g CuSO₄·5 H₂O; 1,6 g CoCl₂·5 H₂O; 11 g H₃BO₃; 1,1g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O; 50 g Na₂EDTA. A kísérleteink előtt glicerolos szuszpenzióról oltottunk le a friss spórák előállításához. A tenyésztés 6 napig tartott minden esetben 37 °C-on.

¹ Az *A. fumigatus* törzseket Prof. Dr. Jean-Paul Latgé professzor úrnak köszönhetjük (Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, Paris, Franciaország).

5.3. Micélium előállítása RNS izolálásához

Az RNS izoláláshoz használt micéliumokat folyékony tápoldatban tenyésztettük 500 ml Erlenmeyer-lombikokban. Az *A. nidulans*-szal végzett kísérletekben a lombikokba 100 ml Barratt-féle tápközeget (a Barratt-féle táptalaj agarmentesen) mértünk és 5×10^7 db konídiospóra-szuszpenzióval oltottunk be, majd a lombikokat 37 °C-on inkubáltuk 16 órán keresztül, 220 rpm (3,7 Hz) rázási sebességgel (Leiter és mtsai., 2016). A 16 óra elteltével a még mindig exponenciális növekedési fázisú tenyészetekhez (Leiter és mtsai., 2016) 0,16 mM MSB-t adtunk a lombikokhoz. A továbbiakban ezek a kezelt tenyészetek, mind a vad típusú, mind a mutáns törzsekből három-három biológiai ismétléssel készültek el (ahogy a kezeletlen tenyészetek is). A kezelés után 30 perc elteltével szűrtük le a tenyészeteket és tettük a micélium mintákat Eppendorf csövekbe, melyeket a további felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

Az *A. fumigatus* törzseinek esetében kissé módosítottunk ezen a protokollon. A micéliumok előállításához a Barratt-féle tápoldat módosított változatát használtunk, ahol a változtatás a következő volt: a táptalaj 1 literre vonatkoztatva 0,92 g diammonium-tartarát (6 g/l NaNO₃ helyett), 0,52 g KCl, 0,52 g MgSO₄, 1,52 g KH₂PO₄, 1 ml mikroelem oldatot, 20 g D-glükózt (10 g/l helyett) (pH=6,5) (Cove, 1966; Fortwendel és mtsai., 2004). A tenyésztés 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban zajlott 100 ml tápoldatban, minden lombikban 1×10^7 konídium szuszpenzió került beoltásra, majd 20 órás inkubálás ment végbe 37 °C-on, ~3,6 Hz-en (220 rpm). 20 óra elteltével adtuk a 6 mM MSB-t a lombikokhoz. A tenyészeteket leszűrtük és -20 °C-on tároltuk.

5.4. A szilárd táptalajon végzett stresszkísérletek körülményei

A szilárd táptalajon végzett kísérletekhez szintén Barratt-féle minimál táptalajt használtunk az *A. nidulans* törzseknél, míg az *A. fumigatus*-szal zajló kísérleteket diammonium-tartaráttal szupplementált táptalajjal hajtottuk végre. Ezeknél a kísérleteknél az 55 °C-ra termosztált folyékony agarba kevertük az MSB különböző koncentrációját. Az MSB törzsoldat koncentrációja 0,5 M, melyből közvetlenül vagy azt tovább hígítva mértük ki a kísérletekhez szükséges koncentrációkat. Az *A. nidulans* esetében 25 µM MSB került a táptalajba, míg az *A. fumigatus*-nál használtunk 0,5 µM, 1 µM és 15 µM koncentrációkat is. Az agar lemezek közepére 5 µl spóraszuszpenziót inokuláltunk 2×10^7 konídium/ml

törzsoldatból, azaz 1×10^5 db-ot (Leiter és mtsai 2016), majd a Petri-csészéket $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 5 napig és a gátlás mértékét a telepek átmérőjének mérésével határoztuk meg.

Az *A. fumigatus* törzsekkel végeztünk olyan kísérletet is, ahol $0,8\text{ mM}$ deferipronnal (DFP) is kiegészítettük a táptalajt. A deferipron törzsoldata 50 mM -os. Ezekben az esetekben a módosított Barratt-féle minimál agar elkészítéséhez használt nyomelem tápoldat nem tartalmazott FeSO_4 -et. A kísérlet menete a továbbiakban megegyezett az előzővel.

Emellett agar diffúziós vizsgálatot is végeztünk az *A. fumigatus* törzsekkel, ahol a diammónium-tartaráttal komplementált táptalaj felszínén $100\text{ }\mu\text{l}$ konídiumszuszpenziót (1×10^7 konídium/ml törzsoldatból, azaz 1×10^6 db-ot) szélesztettünk szét, majd minden lemez közepére pipetta hegygel lyukat vájtunk. A csészék felét közvetlenül szélesztés után beoltottuk $50\text{ }\mu\text{l}$ 12 mM MSB oldattal (a lyukakba pipettáztuk az MSB-t), másik részét pedig 24 óra , $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os inkubálást követően. Majd a tenyészeteket 4 napra $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátba helyeztük. A kísérlet kiértékelésekor megmértük a gátlási zóna átmérőjét.

5.5. Minták előállítása szuperoxid képződés és SOD-aktivitás mérésre

A szuperoxid képződés meghatározásához ugyanazon körülmények között, folyékony tápoldatban végeztünk tenyésztést, mint a 6.2-es fejezetben és az MSB-kezelést követő 30 perc elteltével vettünk a táptalajból mintát. A SOD-aktivitás méréséhez pedig ezekből a tenyészetekből a kezelést követő 5 órával később micéliumot szűrtünk le. Hasonlóan a transzkriptomikai elemzésekhez, itt is $3\text{-}3$ párhuzamos mintát készítettünk (3 kezeletlen vad típusú és mutáns minta, 3 kezelt vad típusú és mutáns minta).

5.6. A szuperoxid képződés mérése

A szuperoxid kimutatásához dihidroetídiumos kezelést alkalmaztunk, a Carter és mtsai (1994) által leírt protokoll alapján. A kiindulásként 1 M dihidroetídium törzsoldatot készítettünk etanolban, és $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. Ezt tovább hígítva 2 mM -os oldatot állítottunk elő. Ebből $100\text{ }\mu\text{l}$ -t 20 ml tenyészethez adtunk, majd a mintákat 1 óra n át inkubáltuk rázógépen, $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on $\sim 3,6\text{ Hz}$ -en (220 rpm). Ezután 6 ml tenyészetet szűrtünk le üvegszűrőn keresztül, melyet desztillált vízzel átmostunk. A micéliumokat Eppendorf csőbe helyeztük és 1 ml 4 fokos , $5\text{ w/v}\%$ -os szulfosalicilsav oldatban vettük fel a mintákat. $10\text{-}20\text{ perc}$ inkubáltunk jégen, majd 10 perc centrifugálás ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 10000 g) után $500\text{ }\mu\text{l}$ felülúszóhoz $500\text{ }\mu\text{l}$ 2 M -os NaOH -t adtunk. A minták fluoreszcenciáját spektrofotométerrel határoztuk meg

($\lambda_{\text{ext}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$) és a képződött etídium mennyiségét etídium-bromid kalibráló sor felvétele után számoltuk ki (Carter és mtsai., 1994).

5.7. A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitás mérése

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitást Oberley és Spitz (1984) módszere alapján határoztuk meg. A mérés alapja, hogy a szuperoxid anionok redukálják a nitro blue tetrazolium-kloridot (NBT), amit spektrofotometriásan lehet követni. Ezt a reakciót a SOD enzim gátolja. A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitásának meghatározásához 1 ml végső térfogatú reakcióelegyet alkalmaztunk, amely 10 v/v% mintát tartalmazott. A reakcióelegy komponensei a következők voltak: 50 mM nátrium-foszfát puffer (pH 7,8), 1,4 mM dietilén-triamin-pentaecetsav (DETAPAC), 70 μM NBT, 0,2 mM xantin, 10 U/l xantin oxidáz, valamint 1000 U/l kataláz. Az enzimaktivitás meghatározása az NBT oxidációjának nyomon követésén alapult, amelyet 560 nm hullámhosszon mértünk, 2 percen keresztül. Kontrollként minta nélküli reakcióelegyet használtunk. Az enzimaktivitást a kontroll és a minta abszorbanciaértékeinek hányadosából számítottuk ki, majd ebből 1-et vontunk le. Mivel a SOD csökkenti az NBT redukcióját, a kisebb abszorbancia nagyobb enzimaktivitást jelent (Oberley és Spitz, 1984).

5.8. A fehérjetartalom meghatározása

A SOD-aktivitás meghatározása céljából micéliumot szűrtünk le a tenyészetekből 5 órával az MSB kezelést követően. Viszont ekkor a tápoldatból is tettünk félre a fehérjetartalom meghatározása céljából. A minták fehérjetartalmát Bradford-reagens hozzáadásával határoztuk meg (Bradford, 1976). 20 μl felülúszó mintához adtunk hozzá 900 μl reagenst és 10 perc szobahőn történő inkubációs idő elteltével a mintákat spektrofotométerrel mértük le, $\lambda=595 \text{ nm}$ hullámhosszon. Az abszorbancia adatokból szarvasmarha szérum albumin (BSA) kalibrációsor segítségével határoztuk meg a fehérjetartalmat, és az így kapott értékeket a fermentlé térfogatára vonatkoztatva mg/l mértékegységben adtuk meg.

5.9. *A. fumigatus* konídiumok túlélése makrofágokkal szemben

Egészséges donorok perifériás véréből származó monocitákból differenciált makrofágokat használtunk a kísérletünkben. A két féle makrofágot (az M1 makrofág

fenotípus létrehozásához granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktort (GM-CSF; Gentaur Molecular Products, London, UK, 80 ng/ml), az M2 makrofág fenotípus indukálásához makrofág kolóniastimuláló faktort használtuk (M-CSF; PeproTech, Brüsszel, Belgium, 50 ng/ml) a differenciálódásukat követő ötödik napon begyűjtöttük, a sejtszám meghatározása után 400 g-n 8 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után friss, teljes RPMI 1640 médiumot adtunk a sejtekhez, majd a makrofágokat 96 lyukú sejttenyésztő lemezekbe oltottuk át 1×10^5 sejt/100 μ l sejtsűrűségben. Minden lyukba 100 μ l 1×10^5 spóra/RPMI 1640 médium szuszpenziót adtunk. Kontrollként olyan mintákat is készítettünk, amelyek csak 100 μ l spóraszuszpenziót és 100 μ l RPMI 1640 médiumot tartalmaztak. A sejtek 37 °C-on, 5%-os CO₂-al dúsított, nagy páratartalmú inkubátorban tároltuk 4 órán át, majd a lemezeket centrifugáltuk (8 perc, 400 G), a felülúszót eltávolítottuk. A makrofágokhoz 200 μ l desztillált vizet adtunk és 10 percen át így lizáltuk a sejteket. A kapott mintákat sorozatos hígítás után Barratt-féle minimál nitrát agarra oltottuk, és az életképes sejtek számát 37 °C-on, 36 órás inkubációt követően telepképző egységek (CFU) meghatározásával értékeltük. Mindkét törzset M1 és M2 makrofágokkal 8-8 párhuzamos ismétlésben vizsgáltuk.

5.10. Az RNS izolálás menete

Az RNS szekvenáláshoz és génexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált RNS-t liofilizált micéliumokból Chomczynski (1993) protokollja alapján TRIzol reagenssel (Invitrogen, Waltham, MA, USA) izoláltuk, majd ezt követően a minták RNS tartalmát előzetesen Nanodrop UV/Vis (Nabi, μ 2 Microdigital) készülékkel mértük le 260 nm-en. Felhasználásig a mintákat -70 °C-on tároltuk. Továbbá az RNS minták tisztaságát a DE ÁOK Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai ellenőrizték mikrofluid elektroforézis rendszerrel (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.11. A nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás menete

A liofilizált micéliumokból miután teljes RNS izolálást hajtottunk végre a TRIzol-módszer végrehajtásával (Chomczynski, 1993), a következő mintákat állítottuk elő három párhuzamos ismétléssel:

Aspegillus nidulans minták:

1. THS30.3 referenciatörzs kezeletlen kultúrái
2. THS30.3 referenciatörzs MSB-vel (0,16 mM) kezelt kultúrái
3. $\Delta sodB$ mutáns kezeletlen kultúrái
4. $\Delta sodB$ mutáns MSB-vel (0,16 mM) kezelt tenyészetei.

A. fumigatus minták:

1. $akuB^{ku80}$ referenciatörzs kezeletlen kultúrái
2. $akuB^{ku80}$ referenciatörzs MSB-vel (6 mM) kezelt kultúrái
3. $\Delta sod2$ mutáns kezeletlen kultúrái
4. $\Delta sod2$ mutáns MSB-vel (6 mM) kezelt tenyészetei.

Az RNS-szekvenálást (a könyvtárkészítéstől a fastq.gz fájlok előállításáig) a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában végezték el. Az egy irányú (single-read) 75 bp-os Illumina RNS szekvenáláshoz szükséges RNS könyvtárat a TruSeq RNS Library Prep Kit-tel (Illumina, San Diego, CA, USA) készítették el a gyártó leírása szerint. A szekvenálás az Illumina NextSeq 500 műszeren ment végbe és mind a 12 mintából elkészült könyvtárat ugyanazon áramlási cella egy sávjában szekvenálták. A kapott leolvasások száma mintánként 22,2 és 36,5 millió között változtak.

5.12. A szekvencia adatok feldolgozása (RNAseq)

A szekvenálásból származó olvasatokat az *A. nidulans* FGSC A4 (https://fungidb.org/common/downloads/Current_Release/AnidulansFGSCA4/fasta/data/FungiDB-56_AnidulansFGSCA4_Genome.fasta) és https://fungidb.org/common/downloads/Current_Release/AnidulansFGSCA4/gff/data/FungiDB-56_AnidulansFGSCA4.gff) illetve az *A. fumigatus* a1163 (https://fungidb.org/common/downloads/Current_Release/AfumigatusA1163/fasta/data/FungiDB-56_AfumigatusA1163_Genome.fasta) és https://fungidb.org/common/downloads/Current_Release/AfumigatusA1163/gff/data/FungiDB-56_AfumigatusA1163.gff) genomhoz illesztettük a HISAT2 szofter (2.1.0 verzió) futtatásával (Kim és mtsai, 2019). Az egyes minták esetében a leolvasások több mint 94 %-a sikeresen illeszkedett az általunk használt referencia genomra az *A. nidulans* esetén, míg az *A. fumigatus*-nál ez az arány 92 % volt. Az, hogy pontosan hány olvasat tartozott egy génhez azt

a featureCounts szoftver (2.0.0 verzió) határozta meg (Liao és mtsai, 2014). A továbbiakban a statisztikai elemzéseket R nyelvben, RStudio (<https://rstudio-education.github.io/hopr/starting.html>) felhasználásával végeztük el. A differenciáltan expresszált géneket a DESeq2 (1.34.0 verzió) (Love és mtsai, 2014) futtatásával kaptuk meg. Az RPKM (olvasatok száma kilobázisonként és millió illesztett olvasatra normalizálva/“Reads Per Kilobase per Million mapped reads”) értékeket az edgeR csomag „rpkm” függvénye határozta meg (Robinson és mtsai, 2010), továbbá a főkomponens analízis (PCA) pedig a „prcomp” függvénnyel történt.

5.13.A transzkriptomikai adatok kiértékelése

Két transzkriptom összehasonlításakor a felül- és alulszabályozott géneket olyan differenciáltan expresszáldó génekként (DEG) definiáltuk (korrigált p -érték $<0,05$), ahol az $|\log_2FC|$ értékek egy meghatározott küszöbértéknél (ha másként nem jelöltük 1-nél) nagyobbak voltak. Az \log_2FC értékek a DESeq2 szoftverrel (1.34.0 verzió) kiszámított $\log_2\text{FoldChange}$ számokat jelenti. Referenciaként az adott törzs kezeletlen tenyészeit (amikor az MSB-kezelés hatását vizsgáltuk egy törzsre) vagy a referencia törzs tenyészeit (amikor a *sodB/sod2* gén deléciójának következményeit vizsgáltuk egy tenyésztési feltétel mellett) használtuk.

A kiválasztott génkészletek összetételének jellemzésére a ShinyGO 0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) platformon, alapértelmezett beállításokat alkalmazva génkészlet-dúsulási elemzéseket (“gene set enrichment analysis”) hajtottunk végre. A háromnál kevesebb gént tartalmazó kifejezéseket vagy a csak egy gént tartalmazó találatokat kihagytuk az elemzésből, és csak a korrigált- $p <0,05$ értékekkel rendelkező találatokat vettük figyelembe az értékelés alatt. Mivel a génkészlet-dúsulási elemzése nagymértékben függ a vizsgált génkészletek méretétől, a DEG-ek elemzését több, különböző \log_2FC küszöbérték beállításával végeztük el: Az *A. nidulans* esetében $|\log_2FC| > 0$, $|\log_2FC| > 1$, $|\log_2FC| > 2$ küszöbértékeket, míg az *A. fumigatus* esetében $|\log_2FC| > 0$, $|\log_2FC| > 0,5$ és $|\log_2FC| > 1$ küszöbérték használtunk.

5.13.1. Az *A. nidulans* adatok elemzése

Az Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a respiráció (“Respiration”) és a szterigmatocisztin klaszter (“Sterigmatocystin cluster”) géncsoportok génkészlet-dúsulási elemzéseinek eredményeit

Fisher-féle egzakt próbával is megvizsgáltuk (“fisher.test” funkció az R projektben; [ww.R-project.org/](http://www.R-project.org/)). A Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”) géneket a FungiDB adatbázisa szerint határoztuk meg, mégpedig a következőképpen: gének, melyek részt vesznek a [2Fe-2S] klaszter-, a [4Fe-4S] klaszter-, a vas-kén klaszter összeszerelésében, és a [2Fe-2S], [4Fe-4S] vagy vas-kén klaszterátvitellel történő fehérjeérésben (2. táblázat).

Az antioxidáns enzim gének olyan gének, amelyek a FungiDB-ben (<https://fungidb.org/fungidb/app>) elérhető adatok szerint feltételezett vagy megfigyelt kataláz, citokróm c peroxidáz, glutation-diszulfid oxidorduktáz, glutation peroxidáz, glutation transzferáz, peroxidáz, peroxiredoxin, szuperoxid dizmutáz és tioredoxin-diszulfid reduktáz aktivitású enzimeket kódolnak.

A szterigmatocisztin temeléséért felelős génklaszter génjeit Inglis és munkatársai (Inglis és mtsai., 2013) tanulmányából gyűjtöttük össze és használtuk fel saját elemzéseinkhez.

A légzés (“Respiration”) géncsoport a FungiDB (<https://fungidb.org/fungidb/app>; hozzáférés: 2023. október 24.) szerint ismert és feltételezett NADH dehidrogenáz, ubikinol-citokróm c reduktáz, citokróm c, citokróm c oxidáz és alternatív oxidáz géneket tartalmazza.

A stresszgéneket pedig a Fungal Stress Response Database (FSRD) (Karányi és mtsai., 2013) *A. nidulans*-ban található stresszgenek alapján azonosítottuk be.

2. táblázat: Az *A. nidulans*-ban vizsgált génklaszterek

| Funkcionális génklaszterek | | Gének száma |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------|
| Fe-S klaszter összeszerelés | Fe-S cluster assembly genes | 24 |
| Antioxidáns enzimek | Antioxidant enzyme genes | 35 |
| Respiráció | Respiration genes | 39 |
| Szterigmatocisztin | Sterigmatocystin cluster genes | 26 |
| Stressz gének | Stress genes | 305 |

5.13.2. Az *A. fumigatus* adatok elemzése

A glikolízis (“Glycolysis”), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a vasfelvétel (“Iron uptake”), a sziderofór klaszter (“Siderophore cluster”), az Fe-S klaszter fehérje (“Fe-S cluster protein”), az Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), a hemkötő fehérje (“Heme binding protein”), a hem bioszintézis (“Heme biosynthesis”), és a riboszóma fehérje (“Ribosome protein”) géncsoportokba tartozó gének feldúsulását a Fisher féle teszttel is megvizsgáltuk (“fisher.test” funkció az R projektben; www.R-project.org/). A riboszómafehérje (“Ribosome protein”) géncsoporthoz az *A. fumigatus* Af293 génjeit a

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) útvonal-adatbázisból gyűjtöttük össze (<https://www.kegg.jp/pathway/afm03010>). A többi géncsoportokat az alábbi helyekről szereztük meg: a glikolízis (“Glycolysis”) gének Flipphi és munkatársaitól (2009), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a vasfelvétel (“Iron uptake”), az Fe-S klaszter fehérje (“Fe-S cluster protein”), az Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), a hemkötő fehérje (“Heme binding protein”), a hem bioszintézis (“Heme biosynthesis”) Emri és munkatársaitól (2022), valamint a sziderofór klaszter gének (“Siderophore cluster”) Inglis és munkatársai (2013) által leírt *A. fumigatus* Af293 génlistájából (3. táblázat).

Ahhoz, hogy az általunk használt *akuB^{ku80}* referencia törzsben is azonosíthassuk a géneket, ortológ keresést hajtottunk végre a OrthoMCL v2.0 (<https://orthomcl.org/orthomcl/app/>) felhasználásával. A homológia kereséshez a blast algoritmust, a megtalált ortológok klaszterezéséhez pedig az MCL (Markov Cluster Algorithm) algoritmust (Enright és mtsai., 2002; Van Dongen, 2008) (www.micans.org/mcl/index.html) használtuk. Az azonosított gének listáját az S7. táblázatban lehet megtekinteni, melynek linkje a dolgozat mellékletek részében található.

3. táblázat: Az *A. fumigatus*-ban vizsgált génklaszterek

| Funkcionális génklaszterek | | Gének száma |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Glikolízis gének | Glycolysis genes | 21 |
| Antioxidáns enzimek | Antioxidant enzyme genes | 34 |
| Vasfelvétel gének | Iron uptake genes | 27 |
| Sziderofór klaszter gének | Siderophore cluster genes | 17 |
| Fe-S klaszter fehérje gének | Fe-S cluster protein genes | 40 |
| Fe-S klaszter összeszerelés gének | Fe-S cluster assembly genes | 13 |
| Hemkötő fehérje gének | Heme binding protein genes | 115 |
| Hem bioszintézis gének | Heme biosynthesis genes | 10 |
| Riboszóma fehérje gének | Ribosome protein genes | 103 |

5.14. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Az RNS-szekvenálásból származó génexpressziós értékeket RT-qPCR módszerrel validáltuk. Az RT-qPCR vizsgálatok megkezdése előtt a mintáinkat DNS mentesítettük a DNase I Kit (Sigma) gyártói leírását kissé módosítva, majd a qPCR reakciót az Xceed qPCR SG 1-step 2x Mix Lo-ROX Kit (Applied Biotechnologies, Praha, Csehország) felhasználásával, a gyártó utasításait követve mértük össze kis módosításokkal. A primerpárokat a 5. és 6. táblázat

tartalmazza. A relatív transzkripciós szintek meghatározásához referencia génként az *A. nidulans* esetében az AN9168 gént (amely egy feltételezett glicerin transzportert kódoló gén) használtuk, míg az *A. fumigatus* mintáknál az AFUB_078400 gént (amely feltételezhetően az 1,3- β -D-glükán szintáz katalitikus alegységét kódolja) használtuk. Az RT-qPCR-ből származó Cq értékeit (az a ciklus szám, amikor a mintában a fluoreszcencia szintje átlépi a detektálható szintet) kivontuk a referencia gén Cq értékeiből, majd ezen értékek különbségeiből kaptuk a $\Delta\Delta\text{CP}$ értékeket a négyféle összehasonlításban. Ezeket az értékeket hasonlítottuk össze a szekvenálásból származó $\log_2\text{FC}$ értékekkel, melyeket ugyanúgy számoltunk ki, négyféle összehasonlításban.

4. táblázat: DNase I összemérése egy RNS mintára, a 96 lyukú-lemez egy vájatába

| | |
|-------------------------------|----------------------------------|
| RNS minta | 1000 ng |
| Enzim puffer | 1 μl |
| DNS bontó enzim | 1 μl |
| 50 mM EDTA | 1 μl |
| DEPC kezelt dH ₂ O | 5 μl -re kiegészíteni |

5. táblázat: Az *A. nidulans* mintáknál használt primerek szekvenciái

| Gén azonosító | Szekvencia | |
|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| AN0241 | Forward:5'-CTTCCACATCCACCAGTTC-3' | Reverse:5'-CAGCGTTACCAGTCTTCTTG-3' |
| AN5577 | Forward:5'-CTTGCTTACGACTATGGCG-3' | Reverse:5'-GTTGATGGCTTTGGAGAGAG-3' |
| AN1131 | Forward:5'-CACCACGCTTCCCTTCTG-3' | Reverse:5'-CTCAAATCGCCAACCTCGC-3' |
| AN0785 | Forward:5'-ATGACCCTCCACCATCAAAA-3' | Reverse:5'-CCTCTACAGAGCCGAACTGG-3' |
| AN9339 | Forward:5'-CCGAGCCCGACAACACTTAC-3' | Reverse:5'-GTTCAGCGACGACAATGACG-3' |
| AN6542 | Forward:5'-GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG-3' | Reverse:5'-AAGAACGCTGGGCTGGAA-3' |
| AN3581 | Forward:5'-TGGCAGAACGGTATCAGCG-3' | Reverse:5'-GCGGACAAGCACGGTAAC-3' |
| AN2846 | Forward:5'-TTACCAGTCCATCAAAGCCAAG-3' | Reverse:5'-TTCAGCCAAGTCCAAAGAGG-3' |
| AN0447 | Forward:5'-GACTTCCCTACCTCCTTCTTG-3' | Reverse:5'-GCTCCACTCTTTTCCACGG-3' |
| AN1800 | Forward:5'-TCATACAATCCGCCTTACAGC-3' | Reverse:5'-ATCCCAATCCTTCATCCCC-3' |
| AN3150 | Forward:5'-AGGAGGGAGGTAGCAAAAAG-3' | Reverse:5'-CAGATGGAGGGTAATAAGGC-3' |
| AN5823 | Forward:5'-GCTTACCTTCTCAACTAC-3' | Reverse:5'-ACTTCAATCACCTCCTCTCC-3' |
| AN1628 | Forward:5'-TGTTGTCGGGTTCTTCCAGG-3' | Reverse:5'-AGGGCTTCATCGGTCTCG-3' |

6. táblázat: Az *A. fumigatus* mintáknál használt primerek szekvenciái

| Gén azonosító | Szekvencia | |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| AFUB_078400 | Forward:5'-GTCAGGTCCCCGTTTCCAAG-3' | Reverse:5'-GGCATCATCCAAGTCCAGGTG-3' |
| AFUB_040950 | Forward:5'-GGTCGTTGTTGCCATCGGTG-3' | Reverse:5'-CATCTTCAGGTTGTCGGTGCG-3' |
| AFUB_006770 | Forward:5'-AAGTCCGAGCGTGAGCGTG-3' | Reverse:5'-GGTGAAAGCGAGCAGAGCG-3' |
| AFUB_068610 | Forward:5'-GGATGGGCTTGGCTTGTC-3' | Reverse:5'-CCTTGCGGTTCTGGTATTGC-3' |
| AFUB_056780 | Forward:5'-GTCCTCACTTCAACCCCTATG-3' | Reverse:5'-AACGCTCTCGGCACCAATC-3' |
| AFUB_014080 | Forward:5'-CAGAAGAAAGCGGCGGAAG-3' | Reverse:5'-AGGGTCGTGTTGAAAGCATC-3' |
| AFUB_073150 | Forward:5'-GCATTGTCCGCTCTCTCTC-3' | Reverse:5'-GGTCTCCAGGTTTCGTATCAG-3' |
| AFUB_011080 | Forward:5'-TCACGGCTCATCATCAGGG-3' | Reverse:5'-CAACAGGCAGTAGTCCAGG-3' |
| AFUB_046060 | Forward:5'-TCACTGCGGCTTCTTTCC-3' | Reverse:5'-ATCTCGTTGTACCTCTGGG-3' |
| AFUB_015490 | Forward:5'-GTGTTTATGCTCTCGGTGATGTC-3' | Reverse:5'-CGGGTCTTCTTCTTCTTCTG-3' |
| AFUB_052420 | Forward:5'-ATTCCACCACGACCAAAACC-3' | Reverse:5'-CACCGATACCTCCTTCTCCAAC-3' |
| AFUB_066210 | Forward:5'-GGCACTGGAGGAAGCAAC-3' | Reverse:5'-GCGGTAGAAGATGTCACGG-3' |
| AFUB_016660 | Forward:5'-CAGTCAGATGCGGGTAGTTG-3' | Reverse:5'-AAGGAAAAGGAGGTAGCGATG-3' |
| AFUB_052300 | Forward:5'-TCATCAGCATCAGCAATCCC-3' | Reverse:5'-TCCACCTCAACAATCTTCATCG-3' |
| AFUB_052310 | Forward:5'-TTGACTGGCGGCACATTC-3' | Reverse:5'-TGGAGGGAGGCTTGGTTTC-3' |

7. táblázat: A reakció egy 96 lyukú PCR-lemez egy vajatában

A reakció egy 96 lyukú PCR-lemez egy vajatában:

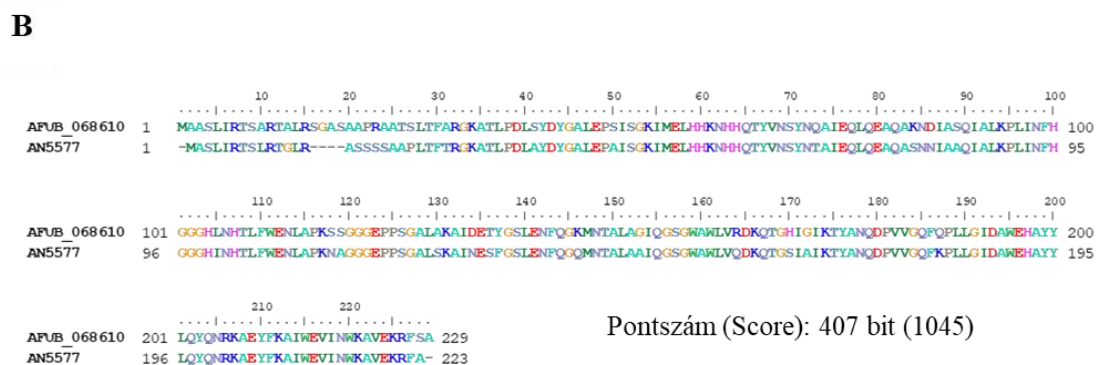
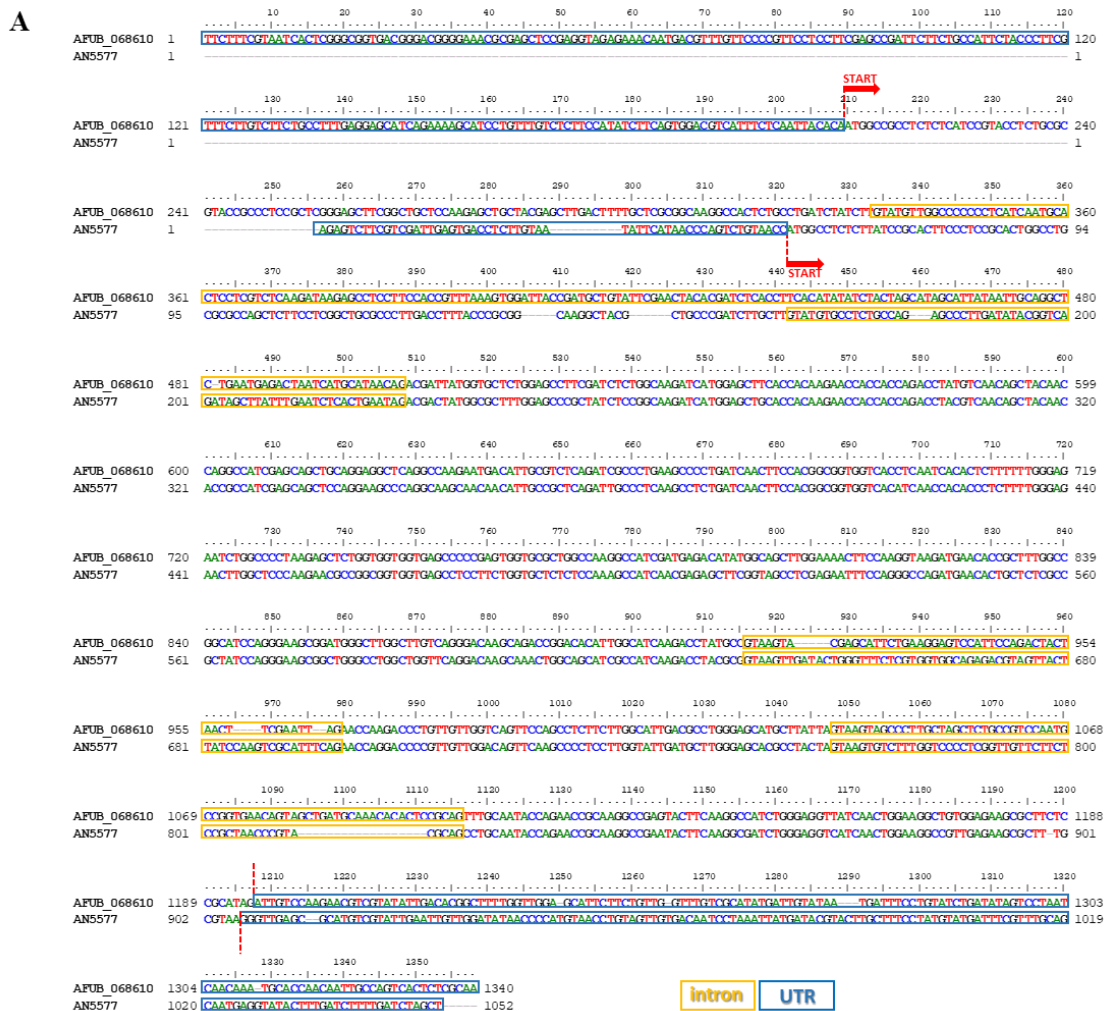
| | |
|-------------------------|--------|
| Master mix | 10 µl |
| Hígított reverz primer | 0,8 µl |
| Hígított forward primer | 0,8 µl |
| Dnázmentesvíz | 2,4 µl |
| Enzim | 1 µl |
| RNS minta | 5 µl |

Az RT-qPCR reakciók az alábbi lépésekből álltak:

1. reverz transzkripció, 55 °C, 10 perc
2. reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 1 perc
3. DNS-denaturáció, 95 °C, 10 másodperc
4. primer hibridizáció („annealing”), 60 °C, 1 perc
5. lánchosszabbítás („extension”), 60 °C, 30 másodperc
6. harmadik lépéstől számított ciklus ismétlés 40 ciklus erejéig

6. EREDMÉNYEK

6.1. A két *Aspergillus* faj mangán tartalmú SOD génjének összehasonlítása

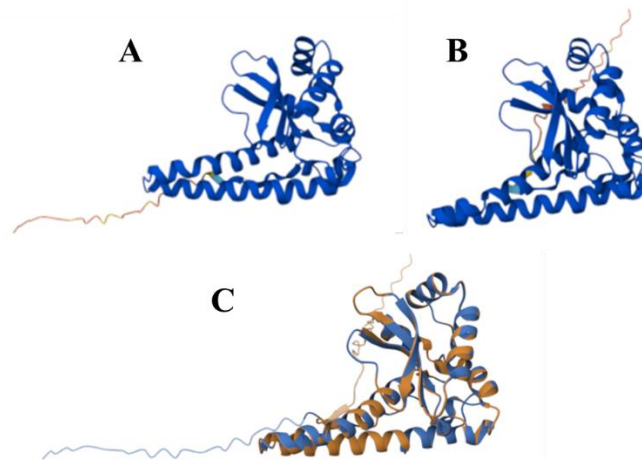


1. ábra: Az *A. nidulans* *sodB* és *A. fumigatus* *sod2* génjének nukleotid- (A) és aminosav szekvenciájának (B) összehasonlítása.

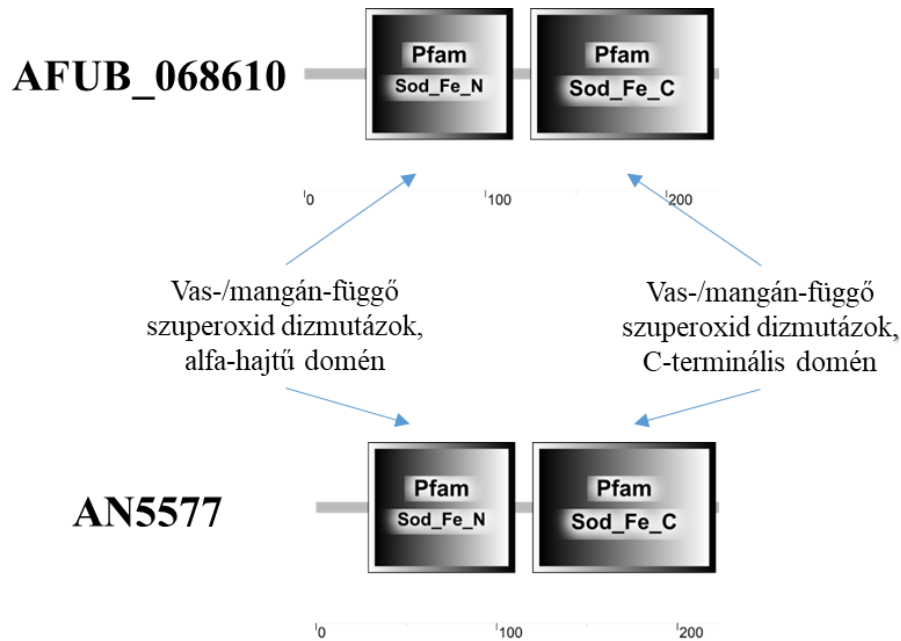
Az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* nukleotid- és aminosav-szekvenciájának összevetésekor igen magas fokú szekvenciahomológiát figyeltünk meg. Az aminosav-szekvencia összehasonlításakor 86%-os azonosságot találtunk (1. ábra). Az NCBI BLAST keresések alapján több *Aspergillus* faj esetében is igen nagy hasonlóság volt kimutatható a mangán-függő SOD fehérjék aminosav-szekvenciájában, ami jelentős mértékű konzerváltságra utal e géncsaládon belül.

Továbbá a SodB és Sod2 fehérjék prediktált 3D-s szerkezeti modelljei is nagyfokú hasonlóságot mutattak. Ez a szerkezeti egyezés különösen jól megfigyelhető volt a két modell egymásra illesztésekor (2. ábra).

A funkcionális domének keresésekor mindkét fehérje szerkezetében két domént azonosítottunk (3. ábra). Az adatbázisok (Pfam) alapján ezek a domének a vas-függő szuperoxid-dizmutázokra jellemző, konzervált struktúrák, nevezetesen: az N-terminális Sod_Fe_N alfa-hajtú és a C-terminális Sod_Fe_C domén. A domének elrendezése és hossza a két fajban nagymértékben megegyezett, ami a fehérjék nagy fokú szerkezeti és evolúciós konzerváltságára utal.



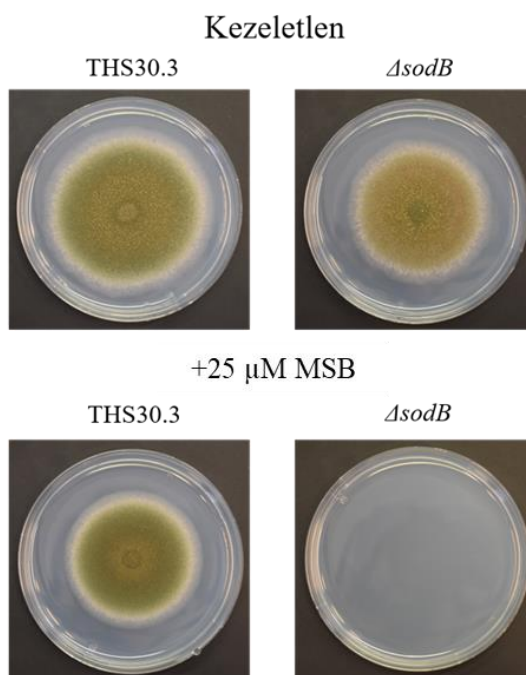
2. ábra: Az *A. nidulans sodB* (A) és *A. fumigatus sod2* (B) 3D-s modellje és azok egymásra illesztett képe (C). Az A és B panel színmagyarázata: -Sötétkék: nagyon magas megbízhatóság (pLDDT > 90), -Világoskék: megbízható (90 > pLDDT > 70), -Sárga: alacsony megbízhatóság (70 > pLDDT > 50), -Piros: nagyon alacsony megbízhatóság (pLDDT < 50), amely utalhat rendezetlen régiókra.



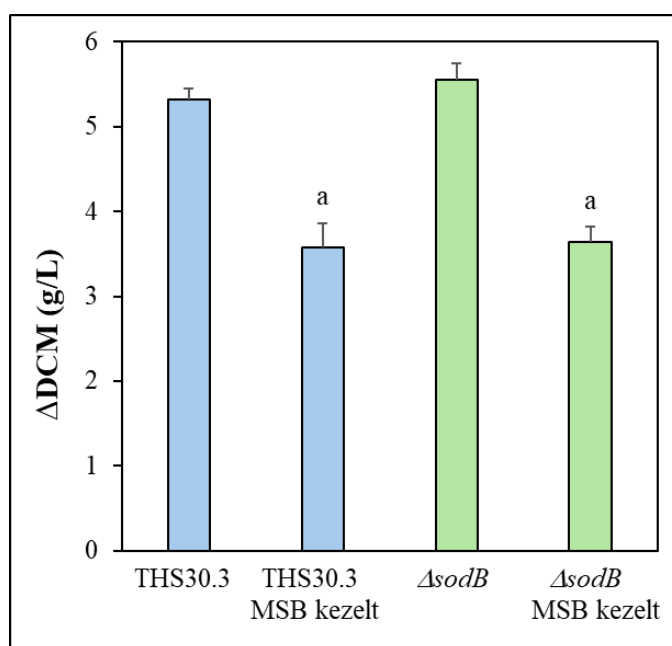
3. ábra: A fehérjeszekvencia alapján azonosított funkcionális domének az AFUB_068610 (*A. fumigatus sod2*) és az AN5577 (*A. nidulans sodB*) enzimekben.

6.2. Az *A. nidulans*-szal végzett kísérletek eredményei

A kísérleteinkben a vad típusú és a mutáns törzs is érzékenyebben reagált az MSB-kezelésre szilárd táptalajon, mint a tápoldatban végzett tenyészetben (4. és 5. ábrák). A $\Delta sodB$ mutáns esetében még látványosabb ez a megfigyelés, mivel felületi kultúrában igen érzékenynek bizonyult, de rázatott kísérletben ugyanazon koncentráción körülbelül hasonló volt a növekedésének gátlási mértéke, mint a vad típusnak (4. ábra).



4. ábra: Az MSB-stressztolerancia vizsgálata. Az *A. nidulans* vad típusú (THS30.3) és $\Delta sodB$ gén deléciós mutáns törzse MSB-vel kiegészített agar lemezen. A reprezentatív felvételek az 5. napon készültek. A Petri-csésze átmérője 85 mm.

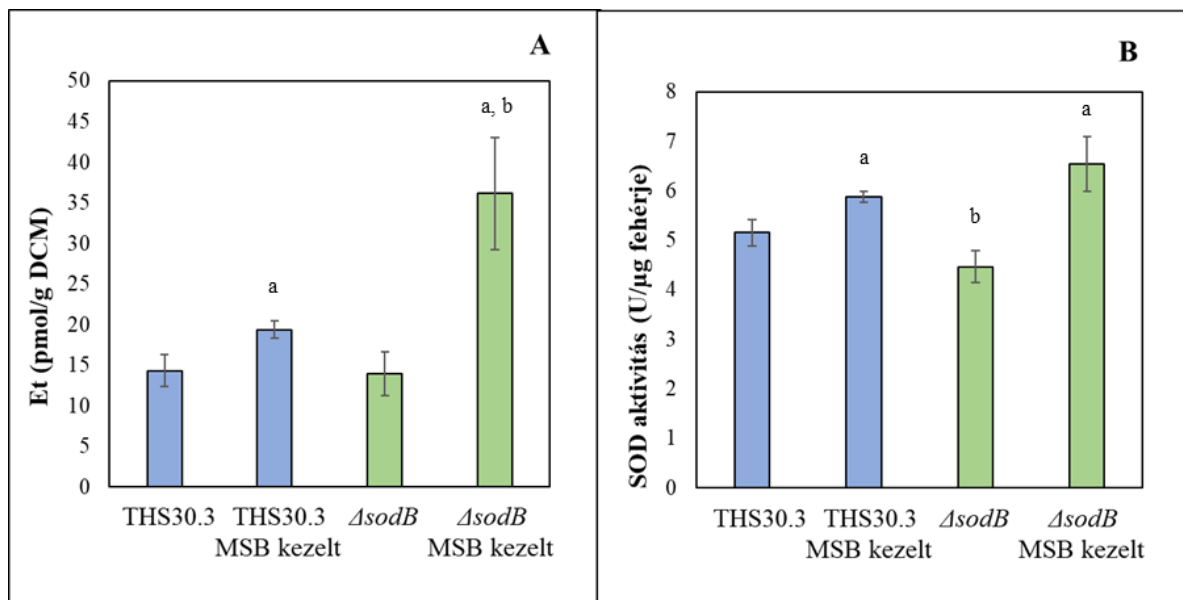


5. ábra: A száraz sejt tömeg (DCM) változása az MSB-kezelés után folyékony tápközegben. Az *A. nidulans* kultúrákat (THS30.3 – vad típusú és $\Delta sodB$ mutáns) 0,16 mM MSB-vel kezeltük. Az eredmények az átlag \pm SD értékeket mutatják, három párhuzamos ismétlés alapján számítva. a – Szignifikáns különbség a kezelt és a megfelelő kezeletlen kultúrák között (kétirányú ANOVA, majd Tukey post hoc teszt; $p < 0,05$).

6.2.1. Intracelluláris szuperoxid képződés és SOD aktivitások *A. nidulans*-ban

Az oxidatív stressz miatt mindkét *A. nidulans* törzsben jelentős mértékben megnőtt a szuperoxid képződést jelző Et-termelődés (6A. ábra). A $\Delta sodB$ deléciós mutánsban az oxidatív stressz hatására az Et-termelés értékei szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a referencia törzsben. A kísérlet eredményéből látható, hogy a *sodB* génnek oxidatív stressz esetén van jelentős szerepe a megnövekedett szuperoxid szint csökkentésében, mivel normál tenyésztési körülmények között a vad típusú törzshöz hasonló Et szintet figyeltünk meg.

Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a specifikus SOD-aktivitás méréséből szignifikánsan kisebb értékeket kaptunk a mutáns törzs kezeletlen tenyészetében, viszont az MSB-kezelés hatására nem volt szignifikáns különbség a referencia törzshöz képest (6B. ábra).

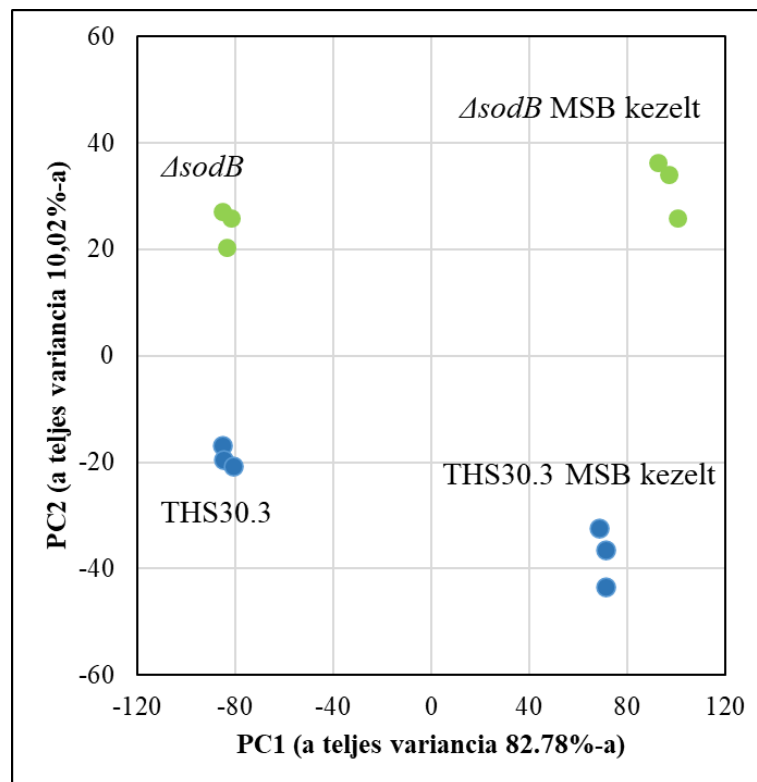


6. ábra: A THS30.3 és a $\Delta sodB$ törzsek mintáinak Et termelése (A) és specifikus SOD aktivitása (B). 0,16 mM MSB-vel kezeltük a folyékony tápközegben lévő tenyészeteket. Az ábrán három párhuzamos ismétlés alapján számított átlag \pm SD értékek láthatók. Jelölések: a – Szignifikáns különbség az MSB-kezelt és a kezeletlen kultúrák között (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$). b – Szignifikáns különbség a mutáns és a referencia törzs között (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$).

6.2.2. Az *A. nidulans* transzkriptom szekvenálási adatainak kiértékelése

Kísérleteinkben különös figyelmet fordítottunk a *sodB* gén deléciója és az MSB által generált oxidatív stressz genom szintű transzkripció változások feltérképezésére. Az MSB jelenléte mindkét törzs transzkriptomában jelentős változásokat okozott és ez a változás önmagában nagyobb mértékű volt, mint a *sodB* gén deléciójának következményei (7. ábra).

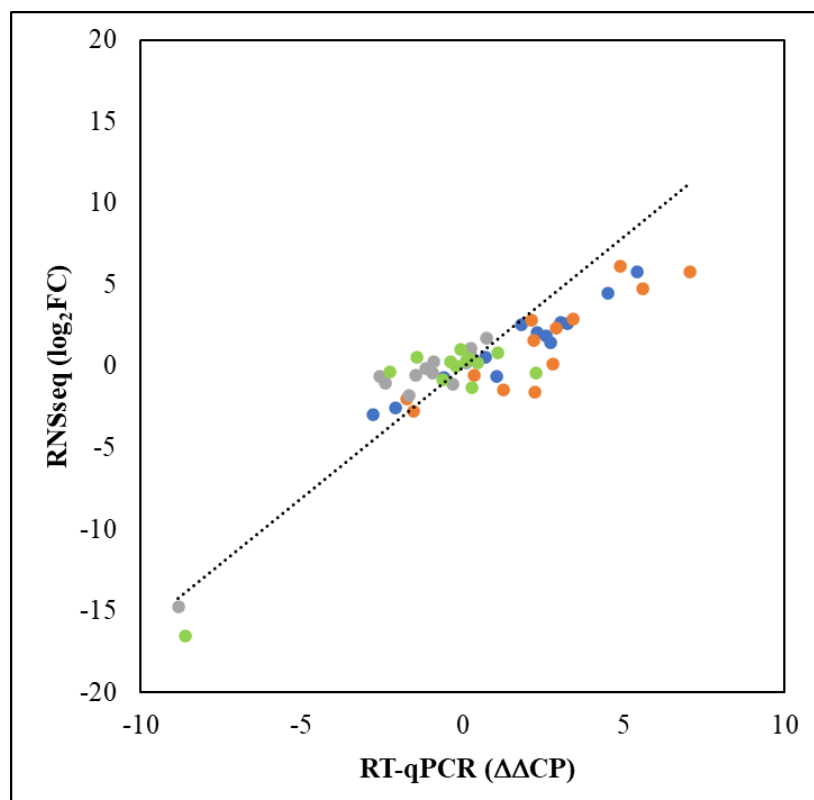
Az adataink jól elkülönülnek egymástól a genotípus és az MSB-kezelés szerint is, amelyet a főkomponens-analízis (PCA) eredményei megerősítettek. A vad típusú és a mutáns törzs kezeletlen adatai a PC2 tengely mentén válnak el egymástól, láthatóvá téve a genotípusból származó különbségeket. Az MSB-kezelés hatására pedig mindkét törzsnél elmozdultak az adatok főként a PC1 tengely mentén. A PCA-ból származó eredmények alapján az ugyanazon minta ismétléseinek adatai közel helyezkednek el ebben a többdimenziós térben, ami jó reprodukálhatóságra utal. Továbbá, az RNS-szekvenálásból származó adatok pozitív korrelációt mutattak a validálásra kiválasztott gének RT-qPCR-ből kapott eredményekkel (8. ábra és S1 táblázat). Az általunk használt referencia gén az AN9168 nem szokványos háztartási gén, de kifejeződése stabil volt a kezeléstől függetlenül (S1 táblázat). A PCA eredményei és az RT-qPCR adatai megerősítik, hogy a szekvenálásból származó adatok megbízhatóak. A kapott eredmények a valós transzkripciós változásokat mutatják.



7. ábra: Az RNAseq adatok főkomponens-analízise (PCA). Az elemzést a DESeq2 szoftver által generált rlog-transzformált génexpressziós adatok felhasználásával végeztük el. Ez tulajdonképpen az összes vizsgált gén normalizált expressziós értékeit adja meg.

A referencia törzs esetében az MSB által okozott transzkripciós változásokat lehetőségünk volt összehasonlítani egy, a Tanszékünk korábbi DNS-chip (nagy sűrűségű 60-

mer oligonukleotid) alapú adatállományával (GSE63019; Gene Expression Omnibus; GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Antal és mtsai., 2020; Emri és mtsai., 2015; Orosz és mtsai., 2017). Ezen adatbázisban található adatokat összevetettük az új, RNS-szekvenálásból származó, mostani adatainkkal. A két adatsor erősen pozitív Pearson-féle korrelációt mutatott (korrelációs együttható = 0,73; S2. táblázat), így megállapítható, hogy a különböző módszerekkel kapott eredményeink (DNS-chip, RT-qPCR, RNS-seq) megbízhatóan írják le az MSB-kezelés hatásának a következményeit.

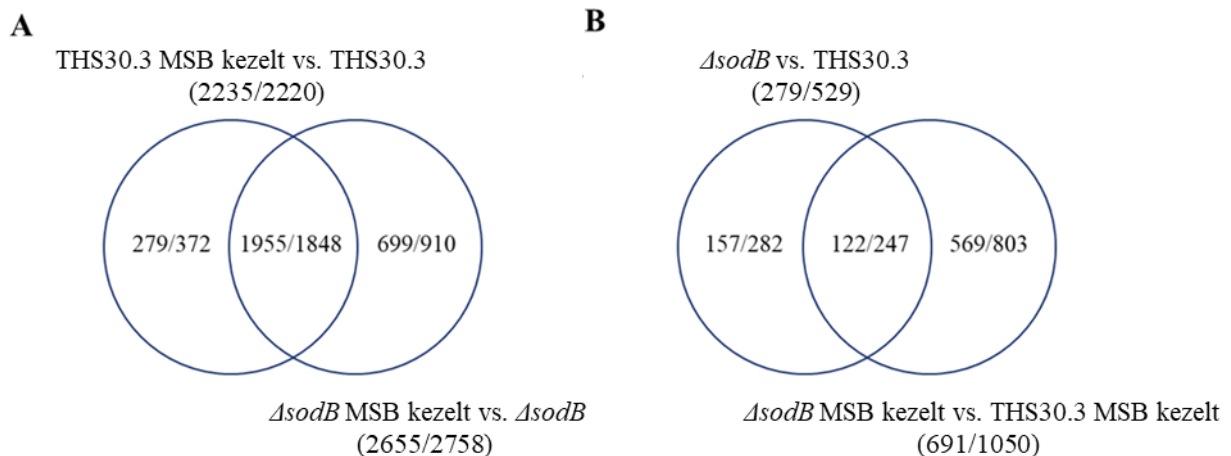


8. ábra: Az RNS-seq-ből származó \log_2FC és RT-qPCR $\Delta\Delta CP$ értékei. A validáláshoz 14 gént választottunk ki, melyek közt felülszabályozott és alulszabályozott gének is voltak. Jelölések: THS30.3 MSB kezelt vs. THS30.3 Pearson korrelációs együttható: 0,97; *ΔsodB* MSB kezelt vs. *ΔsodB* Pearson korrelációs együttható: 0,89; *ΔsodB* vs. THS30.3 Pearson korrelációs együttható: 0,96; *ΔsodB* MSB kezelt vs. THS30.3 MSB kezelt Pearson korrelációs együttható: 0,90.

6.2.3. Az MSB-kezelés hatása a transzkriptomra *A. nidulans*-ban

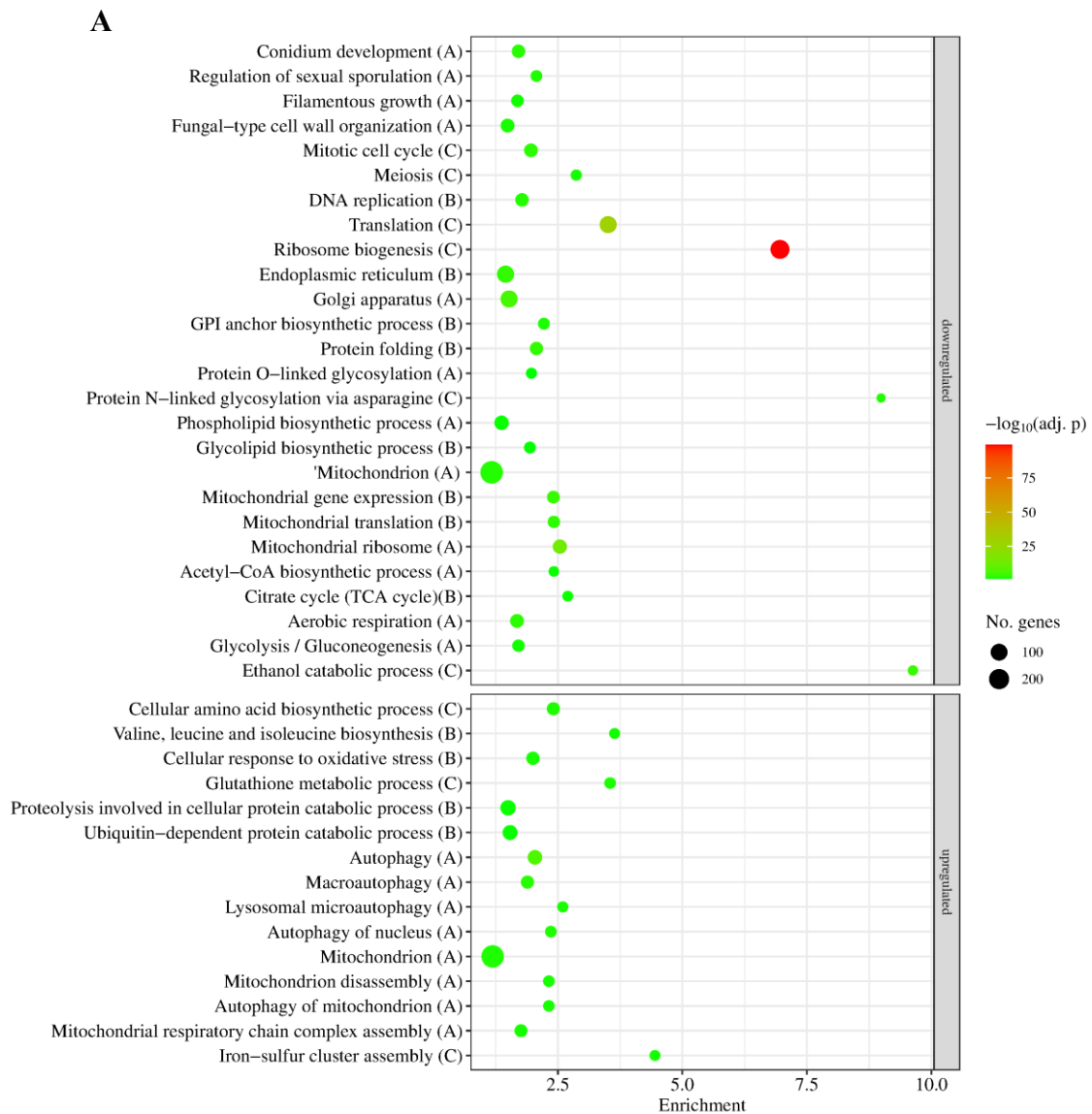
Az MSB stresszre reagáló gének száma nagyságrendileg megegyezett a vad típusú és a mutáns törzsben, ami összhangban van azzal, hogy a *sodB* gén deléciója nem okozott lényeges különbséget az oxidatív stressz elleni védekezésben, ami érthető, hiszen a vad típusú

és mutáns törzs oxidatív stressz érzékenysége hasonló volt a rázatott kultúrában (5. és 9. ábrák). A két törzs MSB-re reagáló génkészleteiben nagy volt az átfedés. A mutánsban felülszabályozott génjei közül 1955 (74%), az aluszabályozott génekből pedig 1848 (67%) mutatott átfedést a vad típus adataival is (9A ábra). Azaz a két törzs hasonló módon reagált a stresszre, és a *sodB* gén hiánya nem befolyásolja drámaian a gomba stresszválaszát ezen körülmények között.

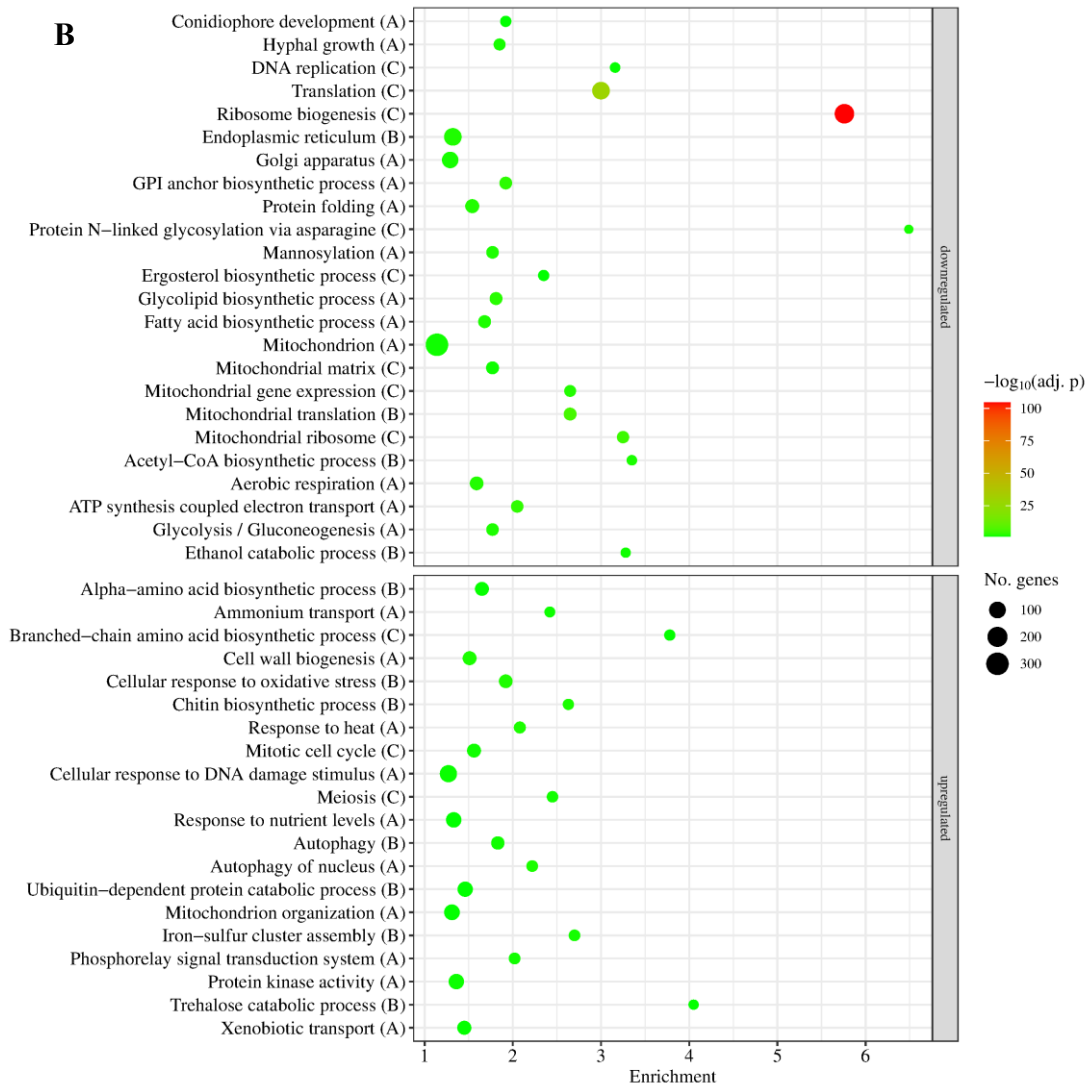


9. ábra: Venn-diagram a felül- és aluszabályozott génekről. A felül- és aluszabályozott géneket olyan DEG-ként definiáltuk, ahol $\log_2FC > 1$ és $\log_2FC < -1$. A panel: Az MSB-kezelés hatása a vad típusú törzsrre (THS30) és a *ΔsodB* mutánsra. B panel: A *sodB* gén deléciójának következményei a kezeletlen és MSB-vel (0,16 mM) kezelt kultúrákban.

A génkészlet-dúsulási elemzések szintén alátámasztják a két stresszválasz hasonlóságát (7. ábra, S3. táblázat). Például a vegetatív növekedéssel kapcsolatos folyamatok, mint a mitotikus sejtciklus (“Mitotic cell cycle”), a DNS replikáció (“DNA replication”), transzláció (“Translation”), riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”), sejtfa biogenezis (“Cell wall biogenesis”), az endoplazmatikus retikulum, továbbá a Golgi apparátus és a mitokondrium funkciói, valamint a glükóz felhasználással kapcsolatos folyamatok mind aluszabályozódtak. Ezzel szemben az autofágia (“Autophagy”), az ubiquitin-függő fehérje katabolikus folyamatok (“ubiquitin-dependent protein catabolic process”), és a sejtszintű válasz az oxidatív stresszre (“Cellular response to oxidative stress”) felülszabályozódtak (10. ábra, S3. táblázat). Mindez azt jelenti, hogy ezen folyamatok génjeinek fokozott kifejeződésével a sejtek az oxidatív károsodások javítását és a sérült fehérjék lebontását fokozhatták, így biztosítva a sejten belüli homeosztázis fenntartását.



10. ábra: Az MSB-kezelés referencia törzsre (A) és *AsodB* mutánsra (B) gyakorolt hatásának génkészlet-dúsulási elemzése (gene set enrichment analysis). A 10B. ábra és leírás a következő oldalon.



10. ábra: Az MSB-kezelés referencia törzsre (A) és *AsodB* mutánsra (B) gyakorolt hatásának génkészlet-dúsulási elemzése. A diagramon a kiválasztott, szignifikánsan dúsult (p korrigált $<0,05$) GO-term-ek láthatók. A GO-termek teljes listája a S2. táblázatban található. A zárójelben szereplő betűk a vizsgált génkészletet jelölik: „A” – valamennyi differenciálisan expresszált gén (*DEG*); „B” – $|\log_2FC| > 1$ kritériumnak megfelelő *DEG*-ek; „C” – $|\log_2FC| > 2$ kritériumnak megfelelő *DEG*-ek.

Ezekon felül, az Fe-S klaszter összeszerelés gének (“Fe-S cluster assembly genes”), az antioxidáns enzimek génjei (pl. a *catA* és *catB* kataláz, továbbá a *glrA* glutation reduktáz gének) és más oxidatív stresszgének szintén felülszabályozódtak az MSB-kezelés hatására mindkét *A. nidulans* törzsben (S1. és S4. táblázatok).

A referencia törzs esetében a *sodA* (AN0241) és a *sodB* (AN5577) gének felülszabályozódtak az MSB jelenlétében (S4 táblázat).

A mitotikus sejtciklus (“Mitotic cell cycle”), a riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”), a transzláció (“Translation”), a citrát ciklus (“Citrate cycle”), az endoplazmatikus retikulum (“Endoplasmic reticulum”) a Golgi apparátus (“Golgi apparatus”) gének alulszabályozása, valamint a vas-kén klaszter összeszereléséért felelős gének (“Iron-sulfur cluster assembly”) és az oxidatív stressz elleni védelem génjei felülszabályozása korábban a referencia törzsnél is megfigyelhető volt a korábbi, DNS-chip alapú munkánál (Orosz és mtsai., 2017).

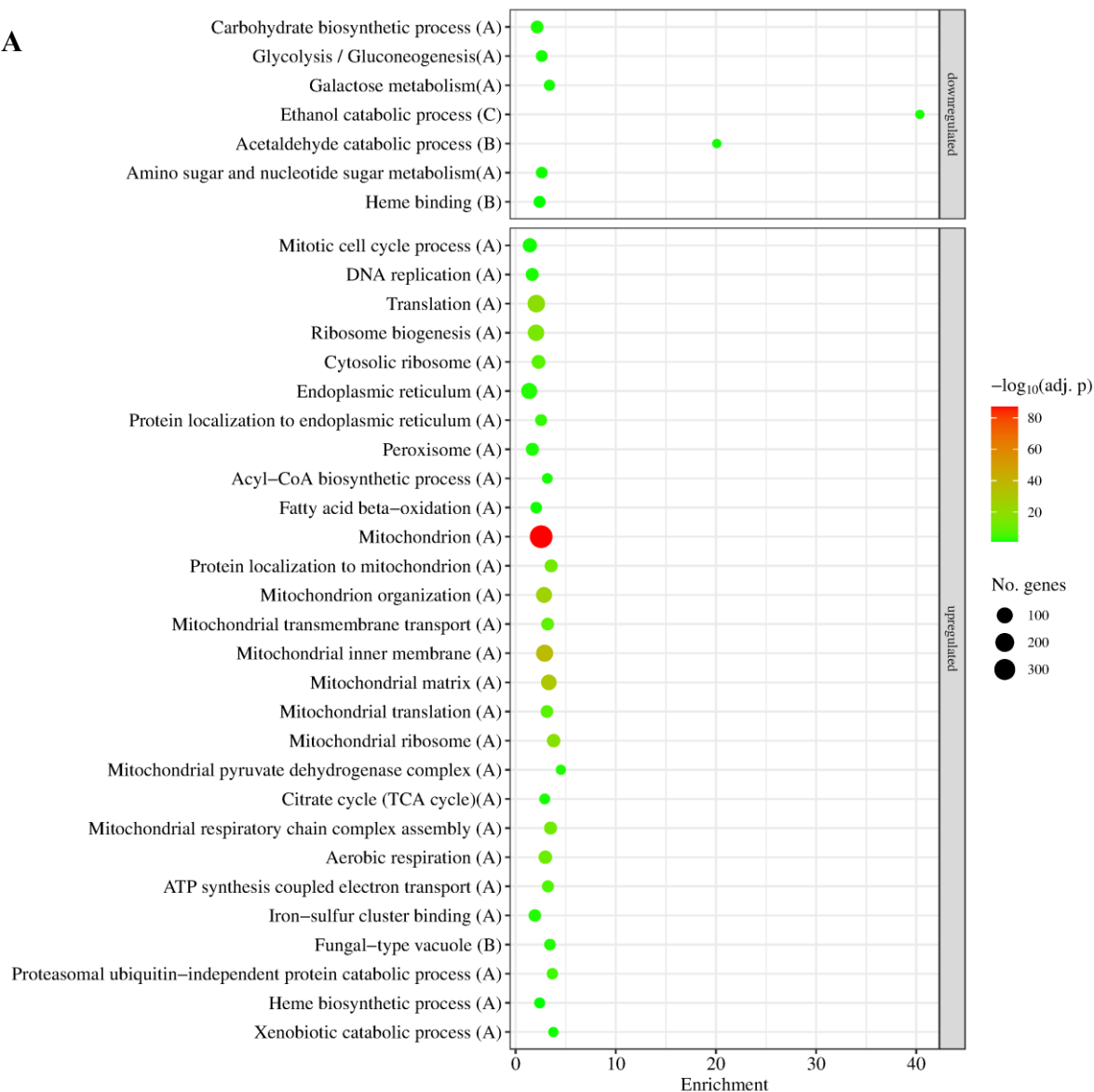
6.2.4. A *sodB* deléció hatása a transzkriptomra *A. nidulans*-ban

Bár a két stresszválasz az *A. nidulans* két törzsében alapvetően hasonló volt, de a két törzs transzkriptomának direkt összehasonlítása feltárt néhány különbséget. A kezeletlen kultúrák esetében (THS30.3 vs. Δ *sodB*) a különbség 808 gén (279 felülszabályozott és 529 alulszabályozott) volt, míg az MSB-kezelés hatására ez a különbség jóval nagyobbra, 1741 génre nőtt (692 felül- és 1050 alulszabályozott gén) (9. ábra).

A génkészlet-dúsulási elemzés eredményei alapján a mutáns és a referencia törzs között több különböző biológiai folyamat mutatott eltérést a vizsgált tenyésztési körülmények esetén. A mitotikus sejtciklus (“Mitotic cell cycle process”) és a DNS-replikáció génjei (“DNA replication”), az ER- és Golgi-függő folyamatok, a fehérjelebontás, valamint a mitokondrium szerveződés (“Mitochondrion organization”) és még további mitokondriális funkciók mind felülszabályozódtak a mutánsban a referencia törzshöz viszonyítva, mind a kezeletlen, mind a kezelt kultúrákban (11. ábra, S3. táblázat).

Ezzel szemben a mitotikus sejtciklus (“Negative regulation of mitotic cell cycle”) és a DNS replikáció (“Negative regulation of DNA replication”) negatív szabályozói, valamint a peroxiszóma (“Peroxisome”) és a stresszválasz (“Stress response”) géncsoportok csak a kezelt mintákban dúsultak fel a felülszabályozott génkészletben. Az MSB expozíció alatt a riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”) génjei szintén az alulszabályozott génkészletben jelentek meg, amikor a Δ *sodB* mutáns adatait vetettük össze a THS30.3-mal (11. ábra, S3. és S4. táblázat).

A



11. ábra: A *sodB* gén deléciójának következményeire vonatkozó génkészlet-dúsulási elemzés kezeletlen (A) és MSB-vel kezelt (B) tenyészetekben. A 11B. ábra és leírás a következő oldalon.

B



11. ábra: A *sodB* gén deléciójának következményeire vonatkozó génkészlet-dúsulási elemzés kezeletlen (A) és MSB-vel kezelt (B) tenyészetekben. A diagramon a kiválasztott, szignifikánsan feldúsult (p korrigált $< 0,05$) GO-term-ek láthatók. A GO-termek teljes listája a S2. táblázatban található. A zárójelben szereplő betűk a vizsgált génkészletet jelölik: „A” – valamennyi differenciálisan expresszált gén (*DEG*); „B” – $|\log_2FC| > 1$ kritériumnak megfelelő *DEG*-ek; „C” – $|\log_2FC| > 2$ kritériumnak megfelelő *DEG*-ek.

A többi *sod* gént megvizsgálva megfigyeltük, hogy a *sodB* gén hiánya a mutánsban nem eredményezte egyetlen vizsgált ismert vagy feltételezett antioxidatív enzim génjének (mint például a *sodA*, *sodM* és AN1131 SOD gént) felülszabályozását sem (S1. és S4. táblázat). Azaz nem találtunk rá bizonyítékot, hogy a *sodB* gén hiányát a sejtek más *sod* gének felülszabályozásával kompenzálná. Viszont az oxidatív stresszel szembeni védelem egyéb

génjeinek expressziójában történt változás MSB jelenlétében. A *catB* kataláz génjének és az AN5440, egy feltételezett citokróm c peroxidáz kódoló génnek jelentősen megnőtt az expressziója a mutánsban. Ezen gének transzkripciója közel a kétszerese volt a mutánsban a vad típushoz képest (S1. és S4. táblázat). Érdekes megjegyezni, hogy az oxidatív stressz jelenlétében a *sodA* kifejeződése is magasabb volt.

Egyik megfigyelésünk az aerob légzés (“Aerobic respiration”) GO-termhez köthető. Kiderült, hogy ezek a gének az alulszabályozott génkészletben jelennek meg a génkészlet-dúsulási elemzésben mind a referencia, mind a mutáns törzsben az MSB jelenlétében. Ellenben, amikor a *sodB* gén deléciójának következményeit vizsgáltuk (Δ *sodB* mutáns vs. THS30.3 referenciatörzs) megfigyeltük, hogy ezek a gének felül szabályozódtak, mind MSB jelenlétében, mind annak hiányában a mutánsban (S3. táblázat).

Ezzel szemben számos NADH dehidrogenáz vagy citokróm c oxidáz alegységet kódoló, illetve feltételezetten kódoló gén felül szabályozódott az oxidatív stresszre, és többségük génexpressziója is nagyobb volt a *sodB* géndeléciós mutánsban a referencia törzshöz képest, függetlenül az MSB jelenlététől (S4. táblázat).

További megfigyelésünk az *aodA/aoxA* gén (AN2099, alternatív oxidáz) transzkripciójához köthető. Ez a gén mindkét törzsben MSB hatására felül szabályozódott, ami azt jelenti, hogy az alternatív oxidáz termelés megnövekedett az oxidatív stressz hatása alatt. Érdekes módon nem volt szignifikáns különbség az *aodA/aoxA* gén kifejeződése között a két törzsben, függetlenül az MSB jelenlététől (S4. táblázat).

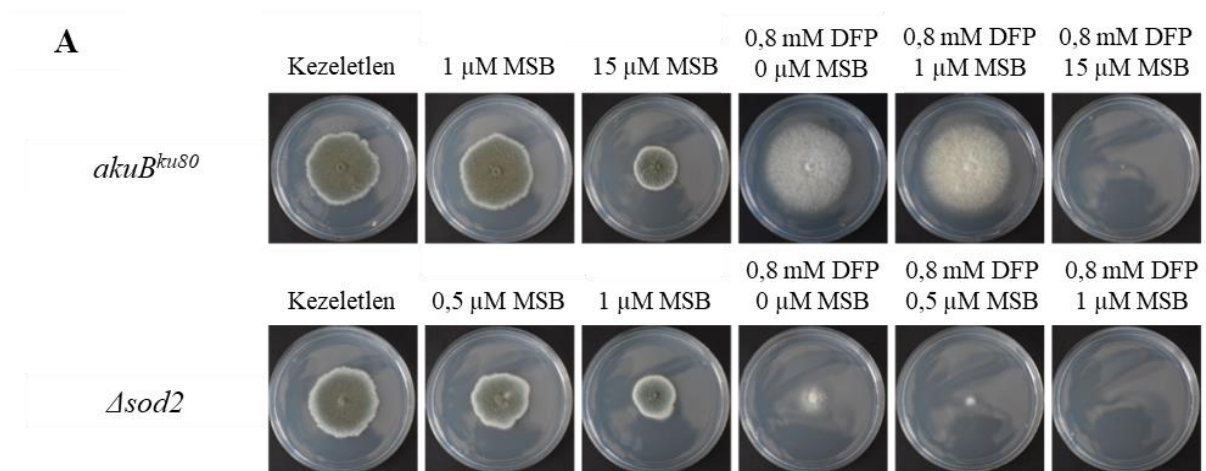
Kitértünk a konídium fejlődés (“Conidium development”) génkészlet vizsgálatára is, melynek tagja a *stuA* (AN5836), egy transzkripciós faktort kódoló gén, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a konídiumok, vagyis a gombaspórák morfogenezisében és fejlődésében. Az adataink szerint mindkét vizsgált törzsben az alulszabályozott génkészletben dúsultak fel ezek a gének, amikor az MSB-vel kezelt és kezeletlen kultúrákat hasonlítottuk össze (7. ábra, S3. táblázat).

Munkánkban a szterigmatocisztin termelésért felelős géncsoport vizsgálatára is kitértünk. A *stcK* gén (AN7814), amely egy poliketid szintáz kódoló, a szterigmatocisztin termelésében nélkülözhetetlen. Az adataink alapján ez a gén a Δ *sodB* mutánsban mind MSB jelenlétében, mind annak hiányában alulszabályozás alatt állt a referencia törzshöz viszonyítva (S4. táblázat). Továbbá, amikor a teljes szterigmatocisztin klaszter szempontjából vizsgáltuk meg az eredményeinket azt találtuk, hogy a mutáns és a vad típusú törzs adatait összevetve az alulszabályozott génhalmazban jelentek meg ezek a gének MSB jelenlétében.

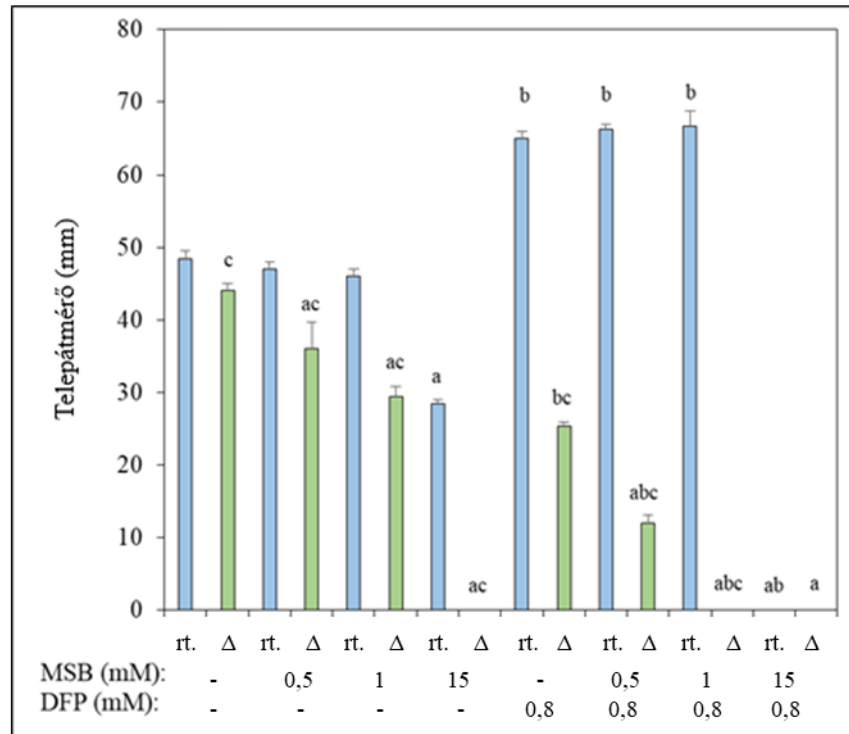
6.3. Az *A. fumigatus*-szal végzett kísérletek eredményei

6.3.1. Az *A. fumigatus* érzékenysége a vaslimitációra

A *sod2* gén deléciója az *A. fumigatus*ban, ahogy előzőleg azt Lambou és mtsai (2010) megállapították, általunk is megfigyelt MSB-re érzékeny mutáns törzset eredményezett (12. ábra). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy vashiány hatására a referencia törzs radiális növekedése fokozódott. Hasonló megfigyelést írtak le korábban Emri és mtsai (2018), amikor szénhiányos körülmények között a gomba a tápanyaghiányos környezetből való eltávolodásra fordított energiát, és az azt elősegítő folyamatokat, mechanizmusokat aktiválta. Az általunk vizsgált $\Delta sod2$ mutáns pedig meglehetősen érzékenyen reagált a deferipron (DFP) vaskötő anyag által előidézett vaslimitált környezetre, amit a 12A. ábra illusztrál. A mutáns már önmagában érzékenyen reagált a vas hiányára és ezt kombinálva az oxidatív stresszel nagy mértékű növekedésgátlást tapasztaltunk mindkét törzsben, de a mutánsban ez a gátlás jóval nagyobb mértékű volt. Ebből a kísérletből megállapítható, hogy az *A. fumigatus* MSB érzékenysége nagymértékben függ a vas elérhetőségétől. Vas hiányában felerősödik az MSB okozta oxidatív stressz hatása és a növekedésgátlás még hatékonyabb ebben a környezetben.



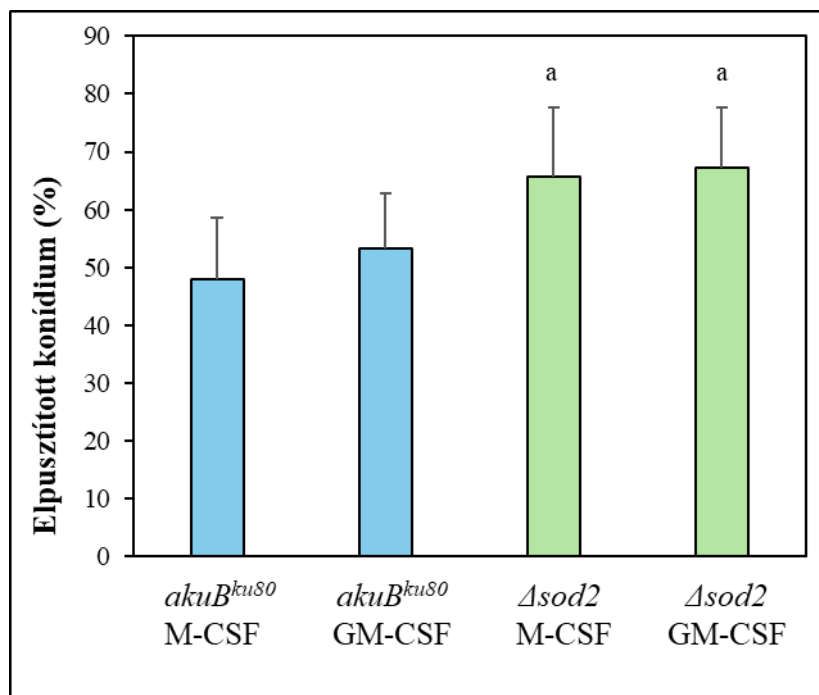
12. ábra: Az MSB-stressztolerancia vizsgálata az *A. fumigatus* *akuB^{ku80}* (rt., kék) és $\Delta sod2$ gén deléciós mutáns (Δ ; zöld) törzsének agarlemezeken, DFP jelenlétében és hiányában. A 12B. ábra és leírás a következő oldalon.

B

12. ábra: Az MSB-stressztolerancia vizsgálata az *A. fumigatus* *akuB*^{ku80} (rt., kék) és *Δsod2* gén deléciós mutáns (Δ; zöld) törzsének agarlemezeken, DFP jelenlétében és hiányában. A panel: Az *A. fumigatus* kultúrák agarlemezeken. A reprezentatív képek az 5. napon készültek. A Petri-csésze átmérője 85 mm. B panel: A telepek átmérője (átlag ± SD, három párhuzamos ismétlés alapján számítva) az 5 napos inkubáció után. Jelölések: ^a – Szignifikáns különbség (Student-féle *t*-próba; *p* <0,05) az MSB-vel kezelt és kezeletlen kultúrák között. ^b – Szignifikáns különbség (Student-féle *t*-próba; *p* <0,05) a DFP-vel kezelt és kezeletlen kultúrák között. ^c – Szignifikáns különbség (Student-féle *t*-próba; *p* <0,05) a két törzs között azonos tenyésztési körülmények mellett.

6.3.2. Az *A. fumigatus* makrofágokkal szembeni érzékenysége

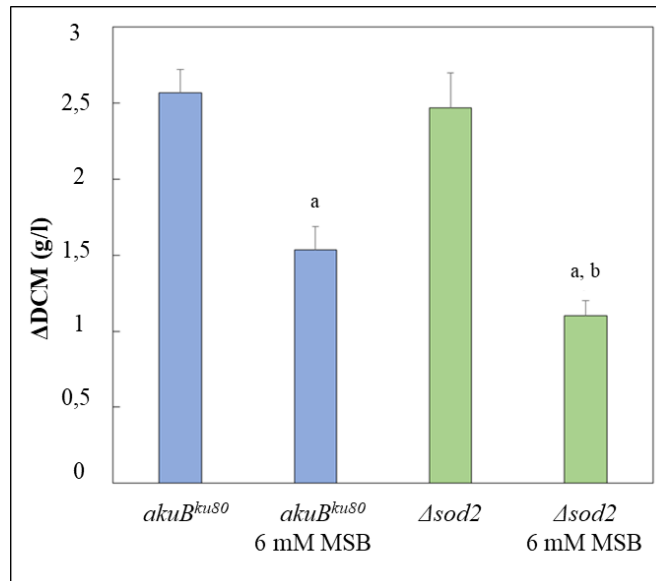
Olyan kísérletet is végeztünk, ahol azt vizsgáltuk, vajon sérülékenyebb-e az *Δsod2* törzs a deléció következtében makrofágokkal szemben. Megállapítottuk, hogy a *sod2* gén deléciója növelte a konídiumok érzékenységét az emberi M-CSF- és GM-CSF-differenciált makrofágokkal szemben (13. ábra). Eredményeink szerint a *sod2* gén által kódolt MnSOD enzim szerepet játszhat a makrofágok által kiváltott oxidatív stressz elleni védelemben, így hozzájárulhat a kórokozó túléléséhez a gazdaszervezet immunválaszával szemben.



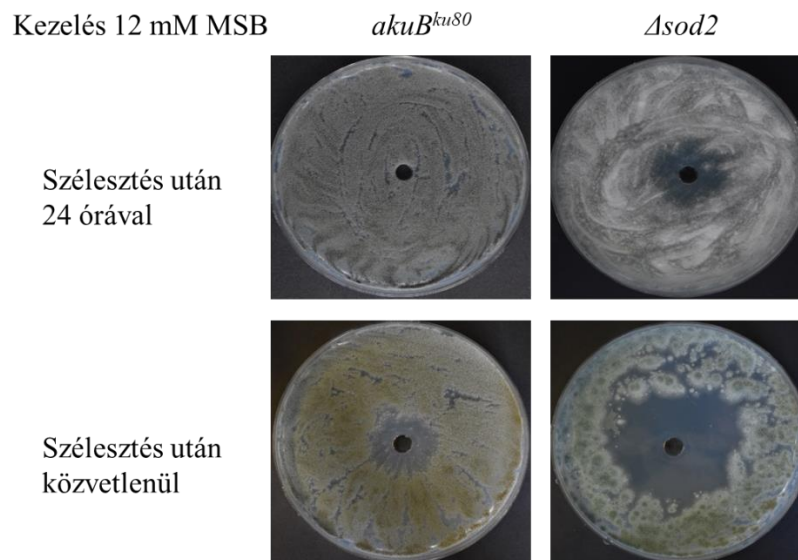
13. ábra. Az *A. fumigatus* spórák (*akuB^{ku80}* és Δ *sod2*) érzékenysége az emberi makrofágokkal (M-CSF- vagy GM-CSF-indukált) szemben. Az adatok átlaga \pm SD (n = 8) formában vannak megadva. a – szignifikáns különbség a Δ *sod2* mutáns és a referencia törzsek között ugyanazon makrofágtípus esetében (Student-féle t-próba; $p < 0,05$).

6.3.3. Az *A. fumigatus* érzékenysége MSB-re

Ahogy azt az *A. nidulans* esetében is megállapítottuk, az *A. fumigatus* is sokkal érzékenyebbnek bizonyult az MSB által előidézett stresszre szilárd táptalajon. Ennél a tenyésztésnél a konídiumok a táptalajba kevert stresszor mellett csíráznak, melynek következtében a gomba növekedése jelentősen csökkent (12. ábra). Ezzel ellentétben, ha már kicsírázott micéliumokhoz adtuk az MSB-t a tenyészetek ellenállóbbak voltak és a növekedés gátlás sem volt olyan mértékű (14. és 15. ábrák), akár folyékony tápközegben hajtottunk végre tenyésztést vagy akár szilárd táptalajon.



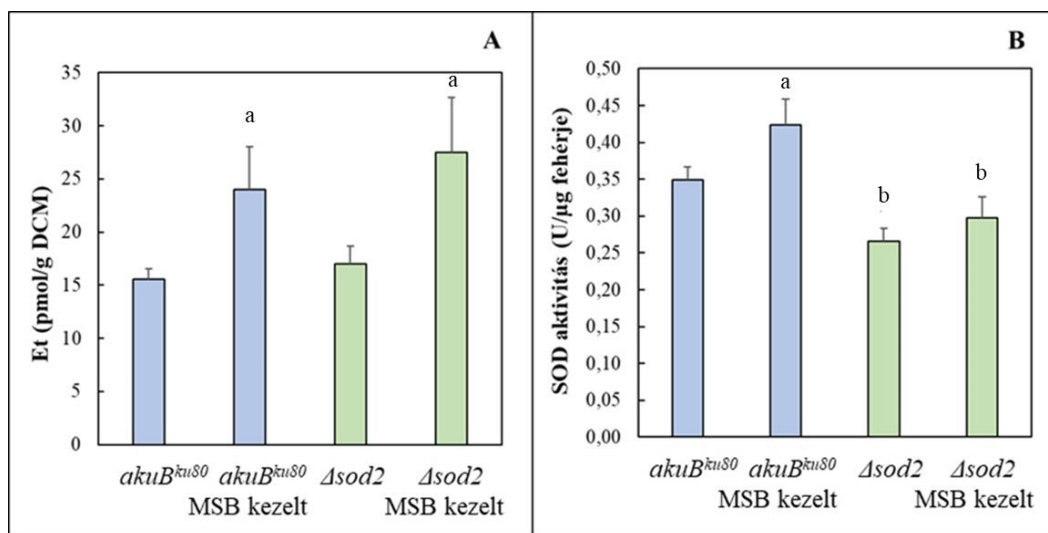
14. ábra: A DCM változása MSB-kezelést követően az *akuB^{ku80}* és Δ *sod2* folyékony tápközegben növekvő kultúráiban. A tenyészetekhez 6 mM MSB-t adtunk. Az eredmények az átlag \pm SD értékeket mutatják, három párhuzamos ismétlés alapján számítva. Jelölések: a – szignifikáns különbség a kezelt és a megfelelő kezeletlen kultúrák között (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$); b – szignifikáns különbség a mutáns és a referencia törzs között azonos tenyésztési körülmények mellett (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$).



15. ábra: Az MSB-kezelés hatása az *A. fumigatus* növekedésére spórázás előtt és után szilárd táptalajon. A reprezentatív felvételek az 5. napon készültek. A Petri-csészék átmérője 85 mm. A konídiumokat egyenletesen oszlattuk el a táptalaj felszínén. Az alsó két csészére közvetlenül a szélesztést követően, a felső kettőre 24 óra elteltével 50 μ l 12 mM MSB oldatot pipettáztunk az agarban kialakított mélyedésekbe (agar diffúziós vizsgálat).

6.3.4. Intracelluláris szuperoxid képződés és SOD aktivitások *A. fumigatus*-ban

Kísérleteinkben megmértük a referencia és mutáns törzsek tápoldatban növekedett tenyészetében képződött szuperoxid szinteket és a specifikus SOD enzimaktivitásokat (16. ábra). Eredményeink szerint mindkét tenyészetben megnövekedett a szuperoxid szint és a SOD-aktivitás az oxidatív stressz hatására. Viszont az $\Delta sod2$ mutáns specifikus SOD-aktivitása, függetlenül az MSB jelenlététől, kisebb volt a referencia törzsben mértékhez képest (16B. ábra). Ennek értelmében a *sod2* gén hiánya csökkentette a gomba védelmét az oxidatív stresszel szemben, továbbá a $\Delta sod2$ törzsben a szuperoxid képződés mértéke az MSB-kezelés után meghaladta a referencia törzsét (16A. ábra).

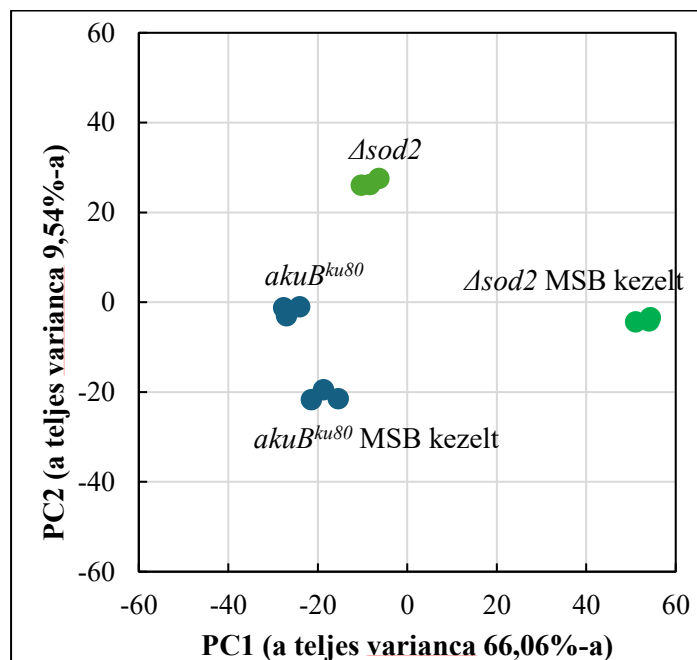


16. ábra: A szuperoxid képződés (A) és a specifikus SOD aktivitás (B) változásai MSB-vel kezelt *A. fumigatus* kultúrákban. Az eredmények az átlag \pm SD értékeket mutatják, három párhuzamos ismétlés alapján számítva. Jelölések: a – szignifikáns különbség a kezelt és a megfelelő kezeletlen kultúrák között (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$). b – szignifikáns különbség a mutáns és a referencia törzs között azonos tenyésztési körülmények mellett (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$). Megjegyzés: Az MSB-vel kezelt $\Delta sod2$ törzs kultúráinak specifikus SOD aktivitása nem különbözött szignifikánsan a kezeletlen *akuB^{ku80}* törzsének értékeitől (Student-féle *t*-próba; $p < 0,05$).

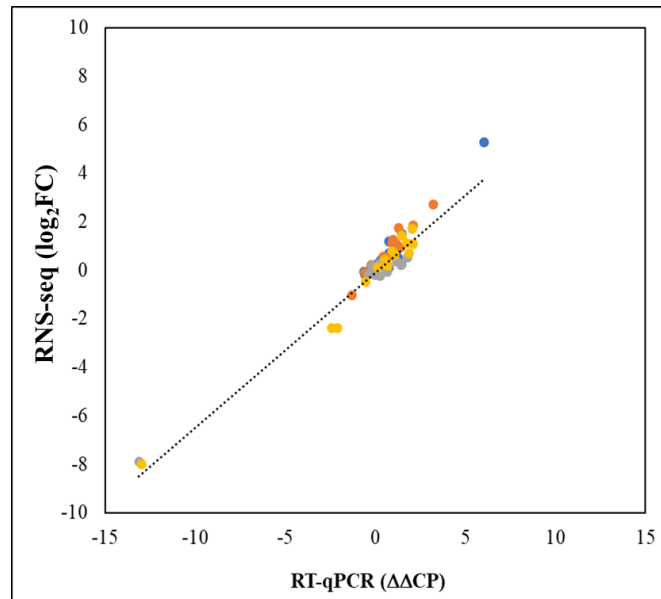
6.3.5. Az *A. fumigatus* transzkriptom szekvenálási adatainak kiértékelése

A transzkriptomikai elemzések első lépéseként főkomponens-analízist végeztünk el, ahol látványosan elkülönültek a négyféle kísérletből származó minták. A 17. ábrán látható, hogy a delécio következtében is történtek változások a mutáns transzkriptomában, mert mindkét tengely mentén elválnak a referencia törzs adataitól. Az MSB-kezelés pedig a referencia törzs adatait nagyrészt a PC2 tengelyen módosította, míg a $\Delta sod2$ esetében mindkét

tengely mentén nagy eltolódás volt tapasztalható a kezelést követően. Már ezen eredményekből következtetni lehet arra, hogy az oxidatív stressz hatására nagyobb változás ment végbe a mutáns transzkriptomában, mint a referencia törzsben. Az analízis alapján a kísérletenként három ismétlés is jó összhangban volt, azaz a vizsgált gének kifejeződésének változásai következetesek voltak a különböző minták között (17. ábra). Továbbá az RNS-szekvenálási adatok és a kiválasztott gének RT-qPCR eredményei között erős korreláció volt megfigyelhető (Pearson korrelációs együttható $> 0,96$, a vizsgált gének száma 14 volt az RT-qPCR validálásban) (18. ábra, S5. táblázat). A referencia gén, melyet az RT-qPCR mérésekhez használtunk nem szokványos háztartási gén, de az expressziós értékei stabilak voltak a stresszkezeléstől függetlenül (S5. táblázat).



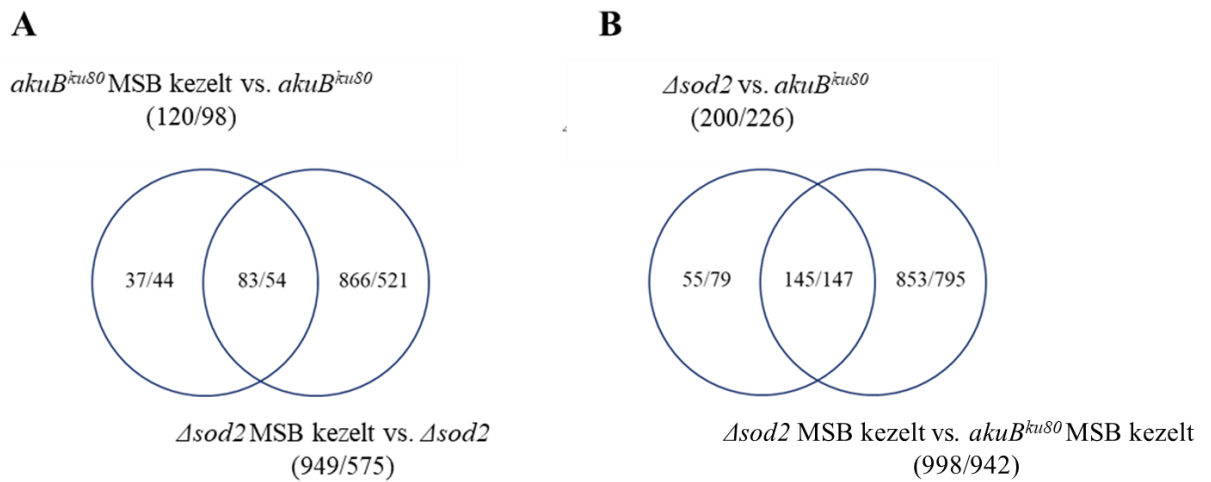
17. ábra: Az RNS-seq adatok főkomponens-analízise (PCA). Az elemzést a DESeq2 szoftver által generált rlog-transzformált génexpressziós adatok felhasználásával végeztük el. Az összes vizsgált gén normalizált expressziós értékei láthatók mintánként.



18. ábra: Az RNS-seq-ből származó \log_2FC és RT-qPCR $\Delta\Delta CP$ értékei. A validáláshoz 14 gént választottunk ki, melyek a felülszabályozott génektől az alulszabályozott génekig, minden géncsoportból származtak. Jelölések: *akuB^{ku80}* MSB kezelt vs. *akuB^{ku80}* Pearson korrelációs együttható: 0,97; *Δsod2* MSB kezelt vs. *Δsod2* Pearson korrelációs együttható: 0,97; *Δsod2* vs. *akuB^{ku80}* Pearson korrelációs együttható: 0,99; *Δsod2* MSB kezelt vs. *akuB^{ku80}* MSB kezelt Pearson korrelációs együttható: 0,98.

6.3.6. Az MSB hatása a transzkriptomra *A. fumigatus*-ban

Az MSB-kezelés következtében mind a referencia, mind a *sod2* gén deléciós törzsek transzkriptomja jelentős változásokon ment keresztül (17. és 19A. ábra). A *Δsod2* mutánsban az oxidatív stresszre reagáló gének száma jelentősen nagyobb volt, mint a referencia törzsben (19A. ábra), továbbá mind szilárd táptalajon (12. ábra, (Lambou és mtsai., 2010)), mind folyékony tápközegben történő tenyésztési körülmények között is nagyobb érzékenységet tapasztaltunk ennél a törzsnél (14. ábra). A referencia törzs stresszre reagáló génjeinek több mint fele a mutánsban is válaszolt az MSB jelenlétére (19A. ábra), jelezvén, hogy a törzsek stresszválaszban sok hasonlóság volt. Ugyanakkor a stressz-függő gének száma közti különbségből látszik, hogy számos gén csak a mutánsban reagált a stresszre, tehát a *sod2* hiányában lényeges változások következtek be a stresszválaszban (19A. ábra). A két törzs között már a kezelés előtt is detektálható különbségek voltak és ezt a különbséget az MSB jelenléte csak tovább növelte (19B. ábra). Mindez alátámasztja azt a feltételezést, hogy a Sod2 enzim az eredményeink szerint fontos eleme a gomba védelmi mechanizmusának, amely segít kivédeni az MSB okozta sejtkárosodást.



19. ábra: A felül- és alulszabályozott gének Venn-diagramjai az *A. fumigatus* törzsekben.

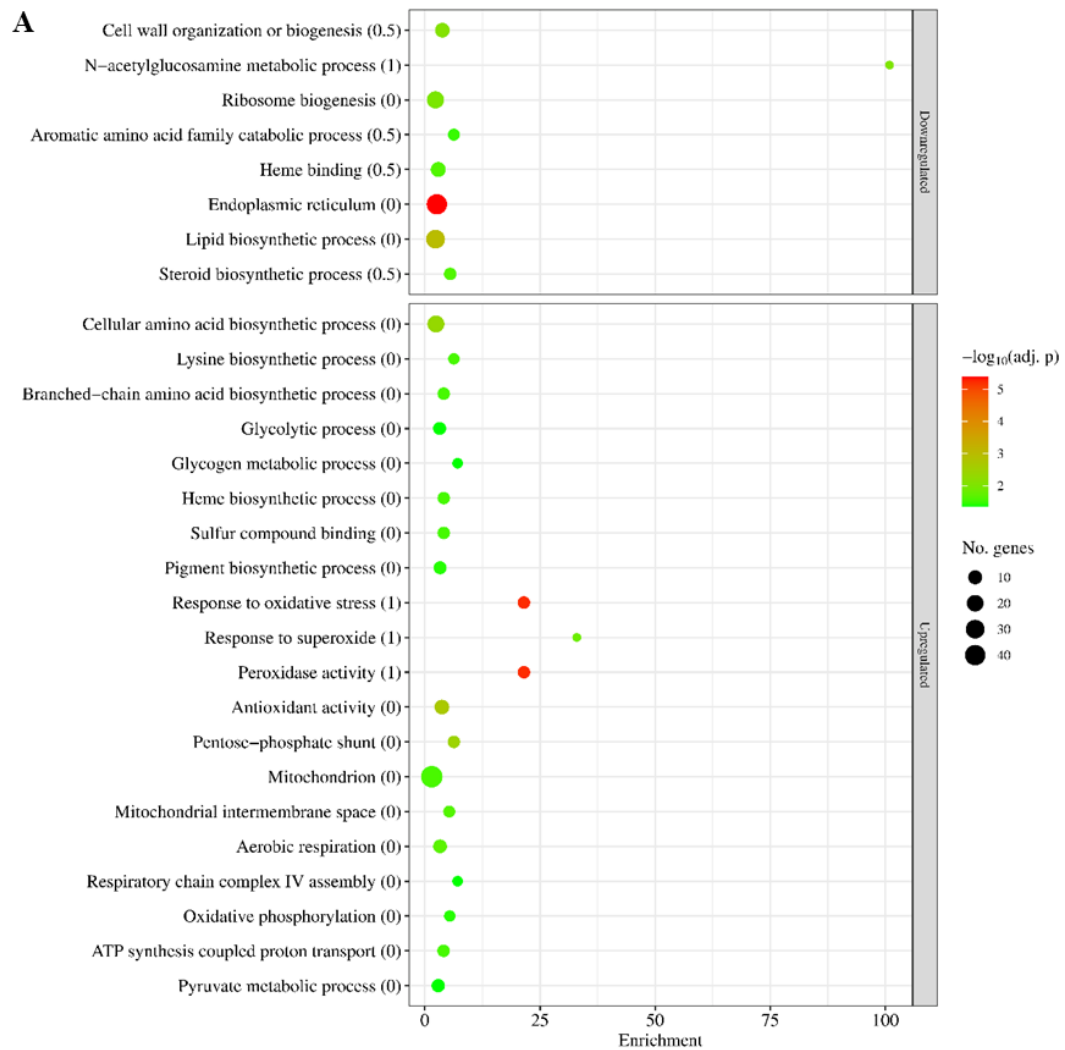
A panel: Az MSB-kezelés hatása a referencia törzsre (*akuB^{ku80}*) és a *Δsod2* mutánsra. B panel: A *sod2* gén deléciójának következményei kezeletlen és 6 mM MSB-vel kezelt tenyészetekben. A felül- és alulszabályozott géneket differenciálisan expresszált génekként (DEG) definiáltuk, ahol $\log_2FC > 1$, illetve $\log_2FC < -1$.

A génkészlet-dúsulási elemzések összhangban voltak a Venn-diagram eredményeivel. A két törzs stresszválaszai között számos hasonlóságot találtunk (17. ábra, S6. táblázat). Az oxidatív stresszválasz (“Response to oxidative stress”), az antioxidáns aktivitás (“Antioxidant activity”), a mitokondriális funkciók, mint a mitokondrium (“Mitochondrion”) és az ATP-szintézishez kapcsolt protontranszport (“ATP synthesis coupled proton transport”) GO- és KEGG útvonalak génei mindkét törzsben a felülszabályozott gének csoportjában dúsultak fel.

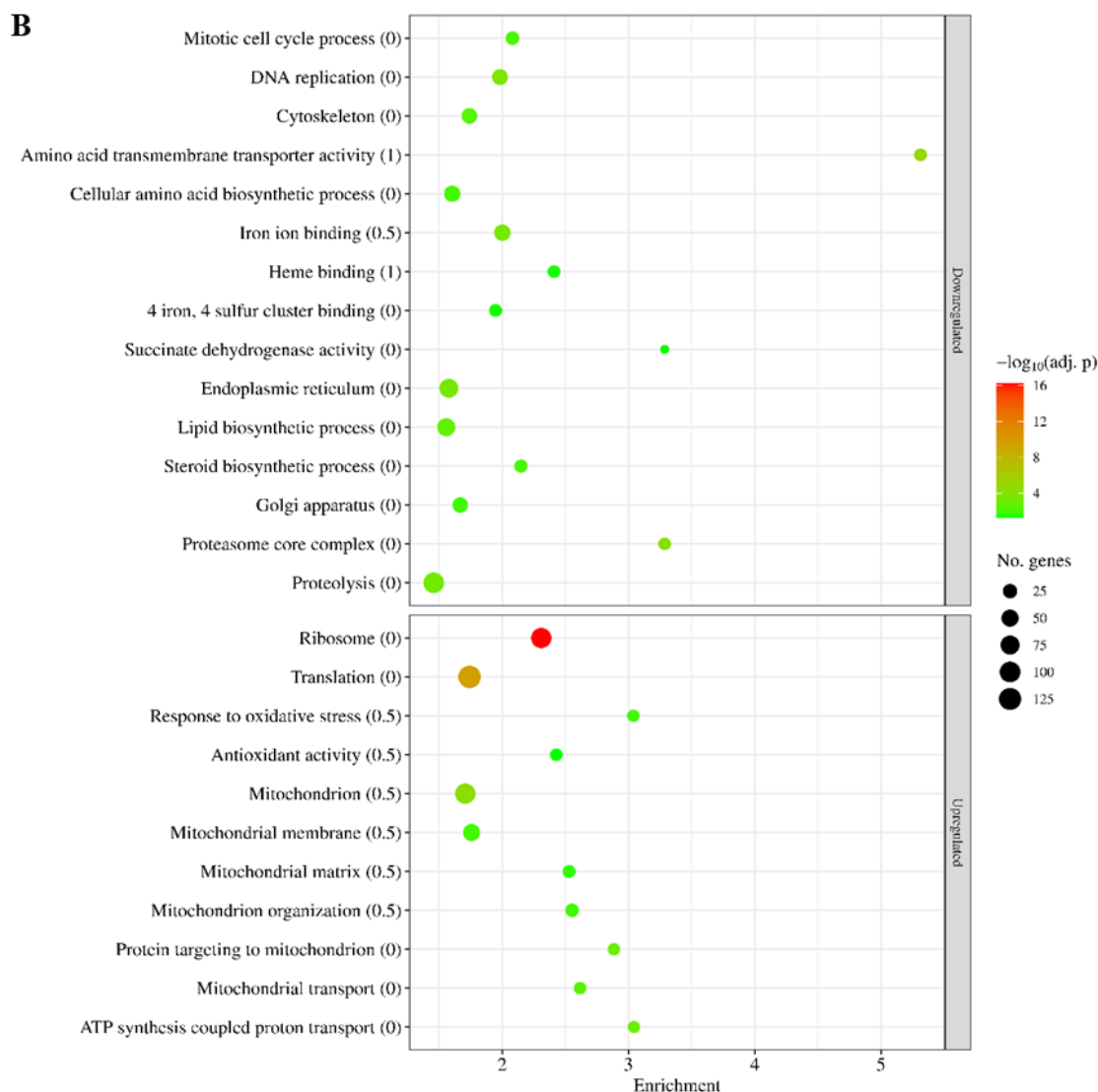
Ezzel ellentétben alapvető sejt folyamatokhoz kapcsolódó génkészletek, mint az endoplazmatikus retikulum (“Endoplasmic reticulum”), a lipid szintézis (“Lipid biosynthetic process”), a szteroid bioszintézis (“Steroid biosynthesis”) és a hem megkötő fehérjéket kódoló gének (“Heme binding”) az alulszabályozott génkészletben jelentek meg nagy arányban mindkét törzsben (20. ábra, S6. táblázat). A vegetatív növekedéshez kapcsolódó gének, mint a riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”) és a sejtfal szerveződés és biogenezis (“Cell wall organization and biogenesis”) a referencia törzsben, míg a mitotikus sejtciklus (“Mitotic cell cycle”) és a DNS replikáció (“DNA replication”) a *Δsod2* mutánsban szintén az alulszabályozott génkészletben dúsultak fel az oxidatív stressz hatására (20. ábra, S6. táblázat). Ez az eredmény összhangban áll az MSB-kezelés után észlelt csökkent

növekedéssel (14. ábra). Ezen folyamatok háttérbe szorulása azt jelzi, hogy a sejtek energiái és erőforrásai inkább a stresszkezelésre és a túlélésre összpontosultak, mint a növekedésre vagy az alapvető sejtanyagcserére.

A hemkötő (“Heme binding”) gének csoportjában fellelhető 108 gén közül 13 expressziójában történt alulszabályozódás a referencia törzsben ($\log_2FC < -0,5$), míg az *Δsod2* mutánsban 45 gén expressziója csökkent (S6. táblázat). Az endoplazmatikus retikulum (“Endoplasmic reticulum”) gének közül 150-ből 40 gén a referencia törzsben, míg 72 gén a mutánsban volt alulszabályozott, míg a mitokondrium (“Mitochondrion”) géneknél pedig 297 génből 48 gén a referencia törzsben és 139 gén expressziója alulszabályozódott a mutánsban (S6. táblázat). Ennek fényében bár az MSB-kezelés hatására hasonló funkciókban történt változás, a válaszok intenzitása nagyobb volt az *Δsod2* mutánsban. A növekedéssel kapcsolatos alulszabályozott gének csoportjai közötti különbségek - például a sejtfa és a riboszóma biogenezis génjei a referencia törzsben, továbbá a mitotikus sejtciklus és a replikáció a mutánsban – is inkább a válasz intenzitásának különbségét tükrözik, és nem a válasz természetét. A két törzs stresszválaszai közötti különbségek közül a leginkább figyelemre méltó különbség a transzlációval kapcsolatos génekben mutatkozott. A riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”) gének a referencia törzsben az alulszabályozott génkészletben dúsultak fel, míg a transzláció (“Translation”) gének a mutáns felül szabályozott génkészletében voltak jelen nagy arányban (20. ábra, S6. táblázat).



20. ábra Az MSB-kezelés hatásának génkészlet-dúsulási elemzése az *A. fumigatus* *akvB^{ku80}* (A) és *Δsod2* (B) törzsek transzkriptomjában. A 20B. ábra és leírás a következő oldalon.



20. ábra Az MSB-kezelés hatásának génkészlet-dúsulási elemzése az *A. fumigatus* *akuB^{ku80}* (A) és *Δsod2* (B) törzsek transzkriptomjában. A kiválasztott, szignifikánsan dúsult (p korrigált $<0,05$) GO- és KEGG-útvonallal kifejezések kerültek bemutatásra. A feldúsult kifejezések teljes listája a S6. táblázatban található. A zárójelben lévő számok a vizsgált génkészletet jelölik: „0” – minden differenciálisan expresszált gén (DEG), „0,5” – DEG-ek $|\log_2\text{FC}| > 0,5$ értékkel, „1” – DEG-ek $|\log_2\text{FC}| > 1$ értékkel.

Részletesebben áttekintve a vas anyagcserét érintő változásokat, elemzéseinkben a két törzs MSB stresszre adott válasza jelentősen eltért (S7. táblázat). Az *Δsod2* törzs MSB által felülszabályozott génkészletében a vasfelvétellel kapcsolatos gének, mint a RIA és a siderofór-közvetítésű vasfelvételi útvonalak génjei, nagymértékű feldúsulást mutattak (S7. táblázat). Ezeket a változásokat a *hapX* gén (a vasfelvétel pozitív szabályozója; (Haas, 2012) AFUB_052420 ortológjának felülszabályozása, valamint a *sreA* gén (a vasfelvétel negatív

szabályozója; (Haas, 2012) AFUB_058830 ortológjának alulszabályozódása kísérte. Továbbá az Fe-S klaszter összeszerelés gének (“Fe-S cluster assembly genes”) szintén felülszabályozódtak az *Δsod2* mutánsban (S7. táblázat). Az Fe-S klaszter fehérje gének (“Fe-S cluster protein genes”), bár nem dúsultak fel sem a felül-, sem az alulszabályozott génkészletekben, jelentős transzkripciós változásokon mentek keresztül az MSB-kezelés hatására a mutánsban (S7. táblázat). A referencia törzsben nem volt megfigyelhető hasonló mértékű változás ezekben a génekben (S7. táblázat).

Érdekes módon a hem bioszintézis gének (“Heme biosynthesis genes”) az MSB-kezelés hatására a referencia törzs felülszabályozott génkészletében jelentek meg (S7. táblázat), míg a hemkötő fehérje gének (“Heme binding protein genes”) mindkét törzsben az felülszabályozott génkészletben voltak kimutathatóak. Ugyanakkor az alulszabályozott készletben a hemkötő fehérje gének (“Heme binding protein genes”) száma a *Δsod2* törzsben lényegesen nagyobb volt, mint a referencia törzsben (S7. táblázat).

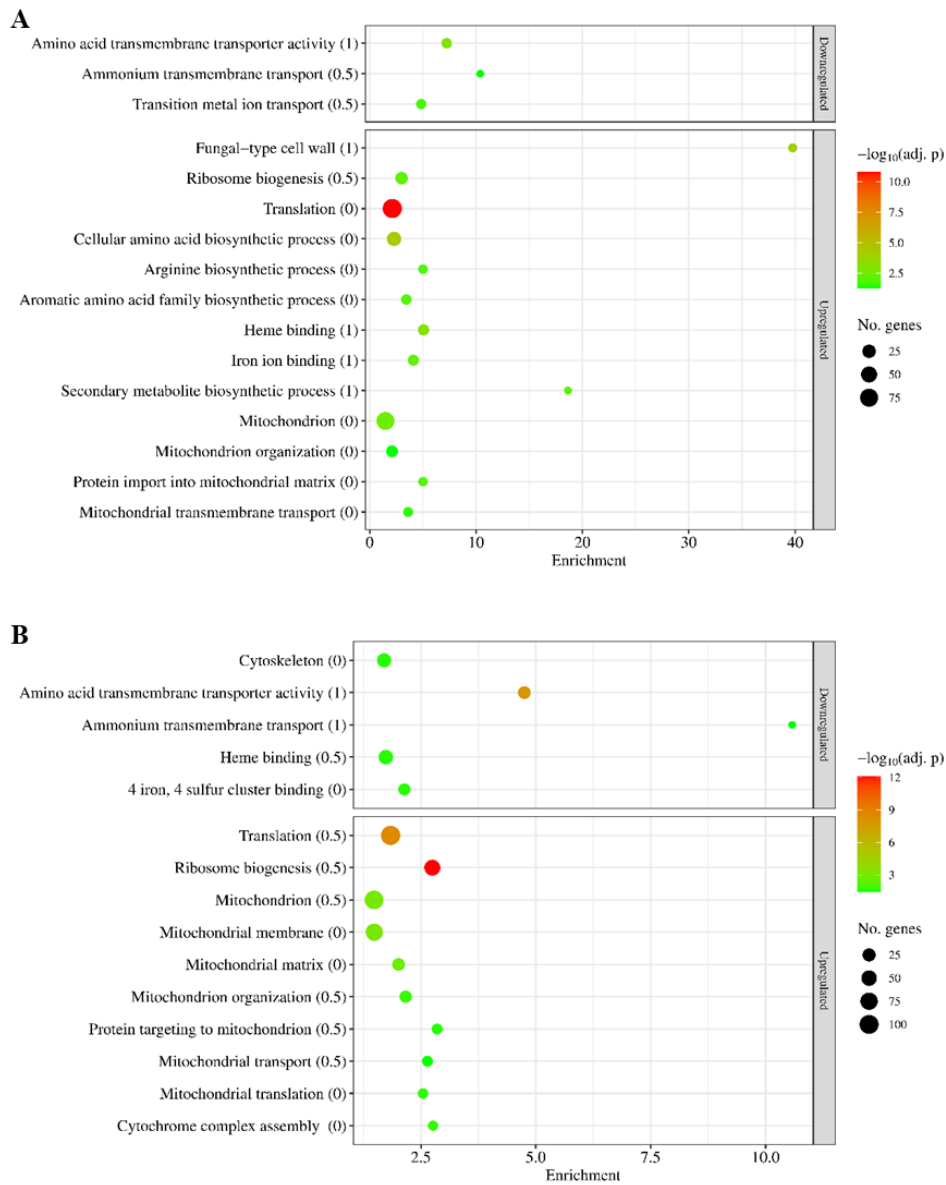
Mind a mitokondriális, mind a citoszólikus riboszóma fehérje gének (“Ribosome protein genes”) az *Δsod2* mutánsban még kezeletlen körülmények között is jelentős felülszabályozódáson mentek keresztül, amit az MSB-kezelés tovább fokozott (S7. táblázat). Ezekből a változásokból arra lehet következtetni, hogy az oxidatív stressz által károsított fehérjék (pl. Fe-S klaszter fehérjék) újraszintetizálása kulcsfontosságú a *sod2* gén hiányában a mutáns számára az MSB stresszhez való alkalmazkodásban.

Az antioxidáns enzimek génjeinek (“Antioxidant enzyme genes”) vizsgálata közben azt az eredményt kaptuk, hogy az MSB-kezelés hatására a felülszabályozott génkészletben dúsultak fel mindkét törzs esetében (S7. táblázat), viszont a *Δsod2* mutánsban jelentősen több gén mutatott szignifikáns felülszabályozódást (22 vs. 12), mint a referencia törzsben (S7. táblázat).

6.3.7. A *sod2* deléció hatása a transzkriptomra *A. fumigatus*-ban

Amikor a két törzs transzkriptomikai adatait hasonlítottuk össze közvetlenül, a mitokondrium (“Mitochondrion”), a riboszóma biogenezis (“Ribosome biogenesis”) és a transláció (“Translation”) folyamataiért felelős gének feldúsulása a felülszabályozott génkészletben volt megfigyelhető mind kezeletlen körülmények között, mind az MSB-vel kezelt kultúrákban is (S6. táblázat). Megfigyeléseink közé tartozik, hogy a hemkötő (“Heme binding”) fehérjéket kódoló gének a felülszabályozott génkészletben dúsultak fel, amikor a kezeletlen kultúrákból származó adatokat vetettük össze (*Δsod2* vs. *akub^{ku80}*). Ugyanakkor ezek a gének, valamint a [4Fe-4S] klaszter kötés (“4 iron, 4 sulfur cluster binding”) gének, az

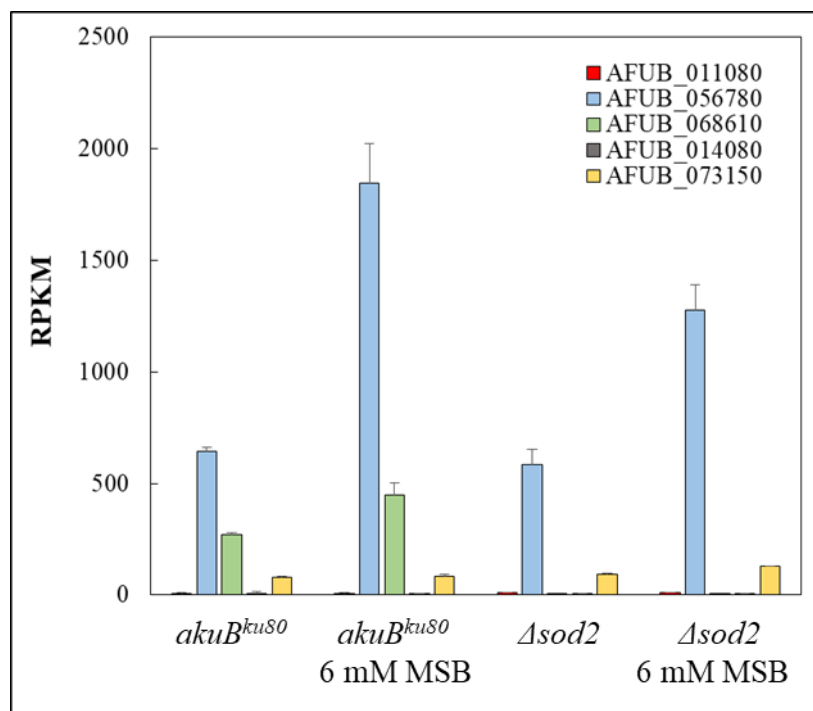
alulszabályozott génkészletben jelentek meg az MSB-vel kezelt kultúrák transzkriptomának összehasonlításakor (*Δsod2* MSB kezelt vs. *akub^{ku80}* MSB kezelt) (21. ábra, S6. táblázat).



21. ábra: A *sod2* gén deléciójának transzkriptomra gyakorolt hatását vizsgáló génkészlet-dúsulási elemzések kezeletlen (A) és MSB kezelt (B) kultúrákban. A kiválasztott, szignifikánsan dúsult (p korrigált $<0,05$) GO- és KEGG-útvonal kifejezések kerültek bemutatásra. A feldúsult kifejezések teljes listája az S6. táblázatban található. A zárójelben szereplő számok a vizsgált génkészletet jelölik: „0” – minden differenciálisan expresszált gén (DEG), „0,5” – $|\log_2\text{FC}| > 0,5$ kritériumnak megfelelő DEG-ek, „1” – $|\log_2\text{FC}| > 1$ kritériumnak megfelelő DEG-ek.

6.3.8. További *sod* gének expressziójának vizsgálata

A *sod2* gén transzkripciója az MSB-kezelés hatására a referencia törzsben megnövekedett, ami azt jelenti, hogy fontos szerepe van a mitokondriumok védelmében oxidatív stresszel szemben (22. ábra, S7. táblázat). Ezzel szemben megfigyeltük, hogy a *sod2* deléció a mutánsban egyetlen más *sod* gén sem kompenzálta szignifikánsan, kivéve az AFUB-073150 gént, amely mérsékelt transzkripciós növekedést mutatott a vizsgálatainkban (22. ábra, S7. táblázat). Az *A. fumigatus* AF293 törzs esetében ez a gén (*sod4*) egy esszenciális SOD-t kódol (Lambou et al., 2010). Érdeemes megemlíteni, hogy a AFUB_056780 (*sod1*) gén transzkripciója mindkét törzsben nagy volt és jelentősen növekedett MSB kezelés hatására (22. ábra). E génnek fontos szerepe lehetett az oxidatív stresszhez való alkalmazkodásban *sod2* gén hiányában is, de tekintettel arra, hogy egy citoszólikus Cu,Zn SOD-t kódol (Lambou et al., 2010) kérdéses, hogy közvetlenül részt tudott-e venni a mitokondriumok védelmében.



22. ábra: Az ismert és feltételezett *sod* gének transzkripciós (RPKM) értékei az *A. fumigatus* *akuB^{ku80}* és Δ *sod2* mutáns törzsekben. AFUB_056780, AFUB_068610 (*sod2*), AFUB_014080 és AFUB_073150 az *A. fumigatus* Af293 *sod1*, *sod2*, *sod3* és *sod4* génjének feleltethetők meg. Az AFUB_011080 egy feltételezett citoplazmatikus Cu/Zn szuperoxid dizmutáz gén. Az AFUB_073150 gén expressziós szintje enyhén megemelkedett MSB hatására.

7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A gombák MnSOD enzimeit kiemelt jelentőségű fehérjék az oxidatív stresszel szembeni védelemben, különösen a mitokondriumok integritásának és funkciójának megőrzésében, mind endogén, mind exogén szuperoxid-anionok által generált stressz esetében (Fréalles és mtsai., 2006; Leiter és mtsai., 2016; O'Brien és mtsai., 2004; Valle és mtsai., 2022). Mindezek mellett számos fontos élettani folyamatra is hatással vannak. Ide tartozik például az öregedés szabályozása, a stacioner növekedési fázisban a túlélés biztosítása (Fabrizio és mtsai., 2003, 2004; Longo és mtsai., 1996; Valle és mtsai., 2022), a patogén gombák invazív képességének elősegítése (Fréalles és mtsai., 2006; Giles és mtsai., 2005; Narasipura és mtsai., 2005; Valle és mtsai., 2022; Xie és mtsai., 2012; Zhu és mtsai., 2018), valamint a szekunder metabolitok, a toxinok termelése (Furukawa és mtsai., 2017; Leiter és mtsai., 2016; Montibus és mtsai., 2013; Reverberi és mtsai., 2013). Megfigyelték, hogy az aszexuális sporuláció folyamatában, a magas vagy alacsony hőmérsékletnek (például tárolás alatt) kitett konídiumok túlélésében, valamint az oxidatív stressz elleni védekezésben is fontos szerepe van az MnSOD enzimeknek (Lambou és mtsai., 2010; Leiter és mtsai., 2016; Xie és mtsai., 2012). Ezek alapján megállapítható, hogy az MnSOD-ok nemcsak az oxidatív stresszre adott válaszok szempontjából meghatározóak, hanem a gombák fiziológiai működésének, alkalmazkodóképességének és túlélési stratégiáinak központi elemei is.

Ebben a munkában az *A. nidulans sodB* génje, és annak ortológja, az *A. fumigatus sod2* génjét állítottuk a vizsgálatok fókuszpontjába, melyek a mitokondriális mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzimet kódolják, így meghatározó szerepük van ezen fonális gombák mitokondriumának védelmében, mind az endogén, mind az exogén oxidatív stressz káros hatásaival szemben (Leiter és mtsai., 2016). A mitokondrium normális működéséhez és integritásához elengedhetetlen ez az enzim. A *sodB/sod2* gén deléciója fokozott érzékenységet eredményezett mind az *A. nidulans*-ban, mind az *A. fumigatus*-ban oxidatív stresszel szemben, melyet egy szuperoxidot generáló vegyület, MSB jelenlétében agarlemezes kísérletekben is tapasztaltunk (1., 9. és 12. ábrák).

A funkcionális domének meghatározása során az adatbázis alapján Sod_Fe_N és Sod_Fe_C doméneket azonosítottunk a vizsgált két *Aspergillus* faj mangán-függő SOD enzimjeinek aminosav-szekvenciája alapján. Ezek a domének nem kizárólag a vas-függő SOD enzimekre jellemzők, hanem általánosan megtalálhatók mind a Fe-, mind a Mn-függő szuperoxid-dizmutázokban, mivel a két enzimtípus egy közös evolúciós ősről vezethető vissza. Ezt a tényt korábban az elméleti bevezetőben már említettem.

A szekvenciaszintű, doménszerkezeti és 3D-s modell szintű hasonlóságok alapján feltételezhető, hogy a SodB és Sod2 enzimek hasonló biológiai funkciókat látnak el. Ezt a megfigyelést alátámasztják az elemzéseink eredményei is. Ugyanakkor megfigyelhetőek bizonyos különbségek abban, hogy a két faj miként alkalmazkodik az oxidatív stresszhez a SodB, illetve Sod2 hiányában.

7.1. Tenyésztési körülmények fontossága

Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált négy törzs MSB toleranciája jelentősen nagyobb volt folyékony tápközegben, mint szilárd táptalajon (2. és 11. ábrák). Azt is elmondhatjuk, hogy a deléciós törzsek esetében ez a különbség még erőteljesebbnek bizonyult, mert az *A. nidulans* $\Delta sodB$ mutáns törzse már 25 μ M MSB koncentráció mellett nem növekedett szilárd táptalajon végzett stresszkísérletben, felszíni körülmények között, míg folyékony tápközegben akár 0,16 mM MSB jelenlétében is csak körülbelül 35 %-os növekedésgátláson ment keresztül a tenyészet (2 ábra). Az *A. fumigatus* $\Delta sod2$ deléciós törzsnél is megfigyeltük, hogy 6 mM MSB mellett értük el a körülbelül 50 %-os növekedésgátlást, míg szilárd táptalajon ehhez 1 μ M is elegendő volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tenyésztési körülmények jelentősen befolyásolják az MnSOD enzimet kódoló gén hiányában megjelenő érzékenységet és a stresszhez való alkalmazkodóképességet.

A kétféle kísérlet – vagyis a szilárd táptalajon és a folyékony tápközegben növekvő kultúrák – közötti legmeghatározóbb különbség az, hogy a szilárd táptalajon végzett kísérletben a konídiumoknak MSB jelenlétében kell csírázniuk és növekedniük. Ezzel ellentétben a folyékony tápközegben lévő tenyészetekhez utólag kerül az MSB a már növekvő, pelletes micéliumokra. Korábbi kutatásokban megfigyelték, hogy a gombák MnSOD enzimei kulcsfontosságúak a konídiumok életképességének megőrzésében, különösen oxidatív stressz alatt (Lambou és mtsai., 2010; Leiter és mtsai., 2016; Xie és mtsai., 2012). Továbbá a mitokondriális aktivitás csírázás alatt jelentősen megnő (Novodvorska és mtsai., 2013; van Leeuwen és mtsai., 2013). Mivel a mitokondriumok Fe-S klaszter fehérjéi különösen érzékenyek az oxidatív stressz által generált szuperoxid-anionokra (Imlay, 2006), a csírázás alatt megnövekedett mitokondriális aktivitás elkerülhetetlenül nagyobb mértékű szuperoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$) képződéssel járhat. Ez egyúttal megnövekedett igényt jelent a szuperoxid-semlegesítő enzimek, például az MnSOD jelenlétére, ami magyarázhatja, hogy a szilárd táptalajon növekvő tenyészetek miért tolerálják kevésbé az MSB okozta stresszt.

Ez a jelenség egyúttal magyarázatot adhat arra is, hogy a mutánsok miért mutattak sokkal nagyobb érzékenységet az MSB-vel szemben szilárd táptalajon, mint a referencia törzs. Ezzel a feltételezéssel összhangban áll az a megfigyelés, hogy amikor az *A. nidulans* micéliumát először celofán lapokon, stresszmentes agaron növesztették („celofán kolónia kultúrák”), majd a cellofánnal együtt áthelyezték stressz ágenst tartalmazó táptalajra, jelentősen megnövekedett toleranciát mutatott *terc*-butil-hidroperoxid (lipidperoxidok termelését serkentő) és nehézfémek (például Cu^{2+} , Cd^{2+}) jelenlétével szemben (Balázs és mtsai., 2010; Boczonádi és mtsai., 2020).

Az *A. fumigatus* törzsekkel elvégzett agar-diffúziós vizsgálatok (12. ábra) alátámasztották azt a feltételezést, hogy a mitokondriumoknak kiemelt szerepe van a konídiumok csírázásakor: a referencia törzs érzékenyebb volt az MSB-vel szemben, ha a konídiumok MSB jelenlétében csíráztak, mint amikor az MSB-t a már kicsírázott, egynapos felületi tenyészethez adtuk hozzá (9. és 12. ábra). Ez különösen fontos, mert az *A. fumigatus* konídiumok belélegzéssel juthatnak be az emberi szervezetbe, a tüdőbe, ahol a fagociták oxidatív és nem oxidatív mechanizmusokkal próbálják eliminálni őket (Drummond és mtsai., 2015; Jia és mtsai., 2023; Saffer és mtsai., 2023). A csírázó konídiumok oxidatív stresszel szembeni nagyobb érzékenysége alátámasztja, hogy a csírázás a fertőzés sikerességének kritikus pontja, ezért a csírázást célzó gombaellenes stratégiák hatékonyabbak lehetnek, mint a növekvő tenyészetek ellen irányulóak (Verburg és mtsai., 2022).

Ezt a megfigyelést a Tanszékünkön folyó korábbi kutatások is leírták: oxidatív stressznek kitett, sikeresen csírázó konídiumok fokozottan képesek alkalmazkodni vaslimitációs körülményekhez, amelyek az emberi szervezetre is jellemzőek (Emri és mtsai., 2022). A konídiumok stressztűrő képessége azonban erősen függ attól, hogy milyen környezeti stresszhatások érik őket a képződésük közben (Hallsworth és Magan, 1995; Kocsis és mtsai., 2022; Rangel és mtsai., 2011, 2015). Ez azt jelenti, hogy azok a tényezők, amelyek növelik a környezetünkben termelődő konídiumok oxidatív stressztűrését, egyúttal növelhetik a fertőzések kockázatát is.

A transzkriptomikai adataink elemzésének eredményei szerint az *A. nidulans* *sodB* gén jelentősen felülszabályozódott az MSB-kezelés hatására a folyékony tápközegben növekvő kultúrákban (S1. és S4. táblázat). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a *sodB* hiányában csökkent a micéliumok SOD-aktivitása, melynek következtében megnövekedett a szuperoxid szint az MSB-kezelést követően a sejtekben (3B. ábra). Meglepő módon a SodB enzim hatásának fontosságával némileg ellentétben, az enzim hiányában az *A. nidulans* mutáns

növekedésének MSB stressz által kiváltott csökkenése hasonló mértékű volt, mint a referencia törzsé a folyékony tápközegben (2. ábra).

Az *A. fumigatus sod2* génje esetében megfigyeléseink jól egyeztek azzal a korábban leírt megállapítással, hogy ez a gén nemcsak a konídiumokban, hanem a növekvő micéliumokban is jelentősen kifejeződik, különösen a későbbi, 20-30 órás inkubációs időszak alatt, élesztőt, peptont és glükózt tartalmazó (YPD) folyékony tápközegben (Lambou és mtsai., 2010). Ezek az eredmények az MnSOD enzim fontosságát támasztják alá a mitokondriumok védelmében, különösen abban az esetben, amikor az exponenciálisan növekvő micéliumoknak szembesülniük kell az MSB által okozott oxidatív stresszel.

7.2. Az *A. nidulans* transzkriptomikai eredményeinek megbeszélése

Az eredményeinket összefoglalva az *A. nidulans* két törzsében az MSB stressz által indukált transzkriptom változások mind intenzitásukban, mind jellegükben meglehetősen hasonlóak voltak (6. és 7. ábra, S3. táblázat). Különbség inkább csak a gének transzkripció aktivitásának mértékében volt. Sok MSB stresszre reagáló gén aktivitása már eleve (a kezelés előtt is) nagyobb volt a $\Delta sodB$ mutánsban, mint a vad típusú törzsben, illetve sok gén a mutánsban nagyobb transzkripció változást mutatott, mint a vad típusú törzsben. Ennek a háttérben álló jelenség egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a két törzs transzkripció válaszai közötti viszonylag csekély különbségek is elegendőek voltak ahhoz, hogy a $\Delta sodB$ mutáns kompenzálja a gén deléciója miatt fellépő változásokat, hátrányokat.

Néhány antioxidatív enzimet kódoló gén, mint például a *ccp1* és az AN5440 (igazolt és feltételezett citokróm c peroxidázok), a *catB* (kataláz), valamint a *trxR* (tioredoxin reduktáz) és a *tpxB* és *trxA* (tioredoxin-függő peroxidáz gének) szignifikánsan nagyobb transzkripció aktivitást mutattak a $\Delta sodB$ mutánsban az MSB jelenlétében, mint a referencia törzsben (S1. és S4. táblázatok). Ugyanakkor, bár a *sodA* (citoszólikus CuZnSOD) kifejeződésében is találtunk növekedést, az *A. nidulans* két törzsének specifikus SOD aktivitása között nem mutatkozott szignifikáns különbség (3B. ábra), amiből arra lehet következtetni, hogy az alternatív antioxidatív mechanizmusok fontos szerepet játszhatnak a $\Delta sodB$ mutáns stresszvédelmében.

Ezenkívül számos stresszválasz-gén – például az oxidatív stresszhez, éhezési stresszhez, pH stresszhez, endoplazmatikus retikulum (ER) stresszhez, valamint DNS-károsodási stresszhez kapcsolódó gének – kizárólag az *A. nidulans* $\Delta sodB$ mutánsában dúsultak fel az MSB-kezelés után a felülszabályozott génkészletben (8. ábra, S3. táblázat). Ennek értelmében

a *AsodB* mutáns vad típusától eltérő transzkripciós válaszai kulcsfontosságúak lehetnek a stressztolerancia biztosításában.

Az MnSOD gének hiányából fakadó káros élettani következmények enyhítésére a gombákban a stressz elleni védekezés egyéb génjei felülszabályozódnak, mint például más endogén antioxidánsok vagy a mitokondriális minőségszabályozó gének (Knuppertz és mtsai., 2017; Lalève és mtsai., 2016; Zyrina és mtsai., 2017). Erre a jelenségre példa az *S. cerevisiae* *Asod2* mutánsának primakvin (maláriaellenes gyógyszer, melyet mikrobiológiai vizsgálatokban mitokondriális stressz és antioxidáns válaszmodellek tanulmányozására használják, ROS-t generál) iránti érzékenysége. Kísérletekben a mutáns érzékenységét aszkorbát és *N*-acetyl-cisztein alkalmazásával lehetett ellensúlyozni, továbbá az *AIM32* (amely egy redox minőségszabályozásban részt vevő, 2Fe–2S klasztert tartalmazó mitokondriális fehérjét kódol), valamint az *MCR1* gén (amely a mitokondriális NADH-citokróm b5 reduktázt kódolja) overexpressziójával (Lalève és mtsai., 2016).

Emellett a glutation/glutaredoxin és tioredoxin rendszerek működésének bármilyen zavara jelentősen növelheti a környezeti stressz hatásait az MnSOD gén deléciós mutánsok esetében (Grant, 2001; Pócsi és mtsai., 2004). Például pékésztőben, *S. cerevisiae*-ben a *SOD2* génjének célzott repressziója (a gén saját promóterét egy galaktóz-indukálható (PGAL1) promóterre cserélték) megnöveli az etanolérzékenységet (a légzési hiányos törzseket kivéve, melyek nem képesek mitokondriális légzésre) azáltal, hogy megakadályozza a Yap1 transzkripciós faktor etanol által indukált relokalizációját. Ez a folyamat közvetve a Trx2 citoplazmatikus tioredoxin izoenzim és a Gsh1 γ -glutamil-cisztein szintetáz fehérjeszintjének csökkenéséhez vezet, mely a glutation bioszintézisének első lépését katalizálja (Zyrina és mtsai., 2017). Tehát a redoxrendszerek és antioxidáns mechanizmusok meglehetősen fontosak az MnSOD hiányát ellensúlyozó adaptív válaszokban.

Nem volt meglepő eredmény, hogy az *A. nidulans* *AsodB* mutánsában a DNS károsodás stresszgénjeinek transzkripciója fokozódott, mivel ezt a jelenséget ugyanúgy a korábban említett *S. cerevisiae*-ben más modellekben is megfigyelték korábban. A Sod2 (mitokondriális MnSOD), a Sod1 (citoszólikus CuZnSOD) és a Ccs1 (a Sod1 szuperoxid dizmutáz réz chaperonja) együttesen fontos szerepet játszanak a DNS épségének fenntartásában, különösen azokban a sejtekben, amelyek már sok osztódáson mentek keresztül (Muid és mtsai., 2014).

Hasonlóképpen, a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőben a *sod2* gén deléciója egyértelműen összefüggésbe hozható a sejtek túlélési idejének csökkenésével a stacioner, nem osztódó fázisban. A *sod2* gén hiánya növeli a nukleáris DNS mutációs gyakoriságát, ami

egyúttal felgyorsítja a sejtfehérjék és a DNS degradációját. Ezek a folyamatok gyakran együtt járnak a sejtek pusztulásával (Ogata és mtsai., 2015).

Az *A. nidulans* $\Delta sodB$ mutáns és a THS30.3 kontroll törzsek MSB stresszre adott válaszai közötti viszonylag kis különbségekre egy másik magyarázat az lehet, hogy a mitokondriális károsodások megelőzése ezekben a kísérleti körülményekben nem feltétlenül kritikus fontosságúak. Elképzelhető, hogy a mitokondriális aktivitás visszafogása, a károsodott fehérjék pótlása, valamint a javíthatatlan mitokondriumok eltávolítása éppen olyan jelentőséggel bír, mint a mitokondriumok integritásának és funkcióinak fenntartása. Ezek a folyamatok együttesen lehetnek szükségesek a fenyegető stresszhatásokhoz való sikeres alkalmazkodás szempontjából (Knuppertz és mtsai., 2017; Stuart és mtsai., 2009).

A transzkripciós változások alapján megfigyelhető, hogy az MSB stressz csökkentette a mitokondriális funkciók aktivitását. Ezt például a mitokondriális transláció, az aerob légzés, valamint az acetyl-CoA bioszintézishez kapcsolódó gének alulszabályozottsága mutatja (6. ábra, S3. táblázat). Ezzel egyidejűleg azonban számos, a mitokondriális összeszerelési folyamatot érintő gén felülszabályozódott. Például a THS30.3 referencia törzsből a mitokondriális légzési lánc komplexek összeszereléséhez kapcsolódó gének, a géndeléciós mutánsban pedig a mitokondrium szerveződésért felelős gének transzkripciója fokozódott, míg az Fe-S klaszter összeszerelésében részt vevő gének mindkét törzs esetében felülszabályozódtak (6. ábra, S3. táblázat). Ezek mellett a mitokondriumok lebontásában és/vagy az autofágiában részt vevő gének transzkripciós szintje is megemelkedett (6. ábra, S3. táblázat), amely arra utal, hogy a sejtek a stresszhatásokra adott válaszukban kiemelt jelentőséget tulajdonítottak a sérült mitokondriumok eltávolítására és lebontására.

Tanszékünkön Leiter és munkatársai (2016) egy korábbi tanulmányukban egyértelműen kimutatták, hogy az *A. nidulans* *sodB* génjének deléciója igen hátrányosan befolyásolta mind a teljes, KCN-érzékeny citokróm c-függő (amely az endogén $O_2^{\cdot -}$ legfőbb forrása), mind az AOX (alternatív oxidáz) függő légzési aktivitást a gomba szénhiányos körülmények között növekedő tenyészetében. Ez a hatás egyértelműen a mitokondriumok aktivitásának nagymértékű csökkenését jelzi az adott kísérleti körülmények között. Ezzel szemben glükózt tartalmazó tápközegben növekedő *sodB* deléciós mutánsok esetében a génhány elsősorban a KCN + SHAM-rezisztens, reziduális légzést befolyásolta, amely sem a citokróm c-függő, sem az alternatív oxidáz-függő légzési folyamatokhoz nem köthető (Bradshaw és mtsai., 2001; Leiter és mtsai., 2016; Molnár és mtsai., 2018).

Kísérleteinkben glükózzal kiegészített táptalajon növekvő $\Delta sodB$ mutáns tenyészetekben az aerob légzéshez kapcsolódó gének (bár nem az *aodA/aoxA* alternatív oxidáz gén)

magasabb szintű expresszióját eredményezte a THS30.3 referencia törzshöz viszonyítva, függetlenül az MSB stresszhatástól (S3. és S4. táblázatok). Ezek a felülszabályozások segíthették a mutáns törzset abban, hogy glükóz jelenlétében a légzési aktivitását a referencia törzs szintjén tudja tartani. Az eredmények alapján megkérdőjelezhető, hogy a *sodB* gén deléciója önmagában komoly veszélyt jelentene a mitokondriumok integritására és működésére, beleértve a légzési folyamatokat, glükózt tartalmazó tápközegben. Valószínűleg a mitokondriális károsodás mértéke szorosan összefügg a környezeti hatásoktól és a tápközeg összetételétől.

Leiter és munkatársai (2016) tanulmányában a tenyészetek szterigmatocisztin termelésére is kitértek és eredményeikben a *sodB* deléció csak a szénhiányos kultúrákban okozott megnövekedett szterigmatocisztin termelést (Leiter és mtsai., 2016). Ezt az eredményt alátámasztják a transzkriptomikai adatainkból származó információk, mivel a bioszintetikus génklaszter érzéketlen volt a *sodB* delécióra és az MSB-kezelésre *A. nidulans*-ban. Bár a SodB fontos a konídiumképződéshez és a konídiumok fenntartásához a felületi tenyészetekben (Leiter és mtsai., 2016), a konídiumfejlődéshez szükséges gének általános alulszabályozódása figyelhető meg a tápoldatban lévő kultúrákban kultúrákban, ahol az aszexuális spórák képződése blokkolva van (Adams és mtsai., 1998).

Végezetül az *A. nidulans*-szal végzett eredményeink alapján azt is feltételezhetjük, hogy bár a *sodB* gén expressziójának felülszabályozása a referencia törzsből fontos eleme volt az oxidatív stresszre adott válasznak, ez önmagában nem bizonyult elegendőnek a mitokondrium károsodásának megelőzésére MSB stressz alatt. Úgy tűnik, hogy a mitokondriális folyamatok, mint például a sérült fehérjék pótlása, a mitokondriális aktivitás csökkentése, és a sérült mitokondriumok eltávolítása jóval nagyobb szerepet játszanak, mint a SodB fehérje az MSB-vel szemben. A sejtekben bekövetkező élettani változások a *sodB* gén hiányában kevésbé voltak jelentősek a vártnál. Ezt jól tükrözték a Δ *sodB* mutáns és a referencia törzsek MSB-kezelésnek kitett folyékony tápközegben növekvő tenyészeiben tapasztalt hasonló transzkriptomikai változások. Másrészt irodalmi adatok szerint a szilárd táptalajon a konídiumok csírázása alatt fokozódik a mitokondriumok aktivitása, ami a szuperoxid termelés megnövekedésével jár. Ezért ebben a fejlődési szakaszban fontos lehet az antioxidatív enzimek, például a SodB jelenléte, hogy megelőzzék a mitokondriális károsodásokat. Úgy tűnik, hogy szilárd táptalajon a SodB hiánya nagyobb érzékenységet eredményez az MSB stresszel szemben, mint más körülmények között (Leiter és mtsai., 2016). Annak igazolására, hogy a SodB kiemelkedő szerepet játszik a konídiumok és a vegetatív szövetek fenntartásában (Lambou és mtsai., 2010; Leiter és mtsai., 2016), micélium- és konídiumtranszkriptomokat

lehetne feltérképezni és összehasonlítani a *ΔsodB* mutáns és a THS30.3 kontroll törzsek stresszmentes és MSB-vel kezelt kultúráiban (Kocsis és mtsai., 2023). Nagy valószínűséggel a hifák és a csírázó spórák (konídiumok) közötti érzékenységbeli különbségek az oxidatív stresszel szemben az eltérő génexpressziós mintázatokra vezethetők vissza.

Korábban végeztek vizsgálatokat Kocsis és munkatársai (2023) *A. nidulans*-on két transzkripciós faktor szerepének meghatározásáról. Az AtfA és AtfB bZIP-típusú transzkripciós faktorok, számos gén kifejeződését szabályozzák. Szerepük van többek között az oxidatív stressz elleni védekezésben is. Ebben a munkában azt vizsgálták, hogy az AtfA és AtfB szerepe a spórákban, csírázás előtt fontosabb lehet, mint a fejlődés későbbi szakaszában. Megfigyelték, hogy a spórákban magasabb volt mindkét transzkripciós faktor mRNS-ének szintje, mint a micéliumokban (Kocsis és mtsai., 2023). Ebből látszik, hogy az *A. nidulans* fejlődésének korai szakaszában az oxidatív stressz problémát jelenthetne, de ez a gomba hatékony védelmi rendszert fejlesztett ki az evolúció folyamán.

7.3. Az *A. fumigatus* transzkriptomikai eredményeinek megbeszélése

Az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* kísérletek eredményeit összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy amíg az *A. nidulans*-ban a SodB hiánya csak kisebb mértékben módosította az MSB kezelésre adott stresszválaszt, addig az *A. fumigatus* esetében a *sod2* gén deléciója jóval jelentősebb változásokat idézett elő az MSB által kiváltott oxidatív stresszválaszban (4. és 14. ábra). Az, hogy az MSB jelenlétében a referencia törzsben megfigyeltük a *sod2* gén kifejeződésének felülszabályozását (19. ábra, S7. táblázat), valamint az, hogy az *Δsod2* mutáns törzs fokozott növekedésgátlást mutatott a referencia törzshöz képest (11. ábra), egyaránt alátámasztja a Sod2 fontos szerepét az oxidatív stressz elleni védekezés folyamatában.

Meglepő módon azonban a Sod2 hiánya nem eredményezte alternatív antioxidáns mechanizmusok aktiválódását a mutáns törzsben. Ehelyett a referencia törzs és a *Δsod2* mutáns oxidatív stresszválaszai közötti eltérés elsősorban a válasz intenzitásában fejeződött ki. Ennek következtében, bár az *Δsod2* mutánsban több MSB-kezelésre reagáló gént azonosítottunk, mint a referencia törzsben (15. ábra), ezek a gének nagyrészt ugyanahhoz, vagy nagyon hasonló biológiai folyamatokhoz kapcsolódtak, mint a referencia törzs által aktivált gének (13. és 16. ábra, S7. táblázat). Ezek a mennyiségi különbségek arra utalnak, hogy a Sod2 enzim jelentős mértékben csökkenteni tudta az MSB mitokondriumokra gyakorolt káros hatásait ezen körülmények között.

Az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* oxidatív stresszválaszai közötti különbségek molekuláris háttere nem ismert, és nem feltétlenül áll közvetlen kapcsolatban az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* génjével vagy annak szabályozásával. Érdekes volt látni, hogy az *A. fumigatus* micéliumnövekedésének gátlásához 6 mM MSB szükséges (2. ábra), míg az *A. nidulans* micéliumában ugyanezt a hatást már 0,16 mM MSB is kiváltotta (10. ábra). Ez jelentős különbséget mutat a két faj között, amely hozzájárulhat jelentősen eltérő virulenciájukhoz is.

A vasanyagcsere terén megfigyelt jelentős transzkripciós változások, amelyek együtt jártak a riboszóma fehérje (“Ribosome protein”) gének felülszabályozásával (16. ábra, S6. és S7. táblázatok), kizárólag az $\Delta sod2$ deléciós mutáns adataiban voltak kimutathatók. Korábbi tanulmányok szerint az MSB a mitokondriumokban is szuperoxid-anionokat generál (Goffart és mtsai., 2021), és ezek súlyosan károsítják az Fe-S klasztereket, amelyek sérülékenységét már megfigyelték korábban is (Imlay, 2006). Adataink szerint az MSB miatt kialakuló magas szuperoxidszint (12.a ábra) a Sod2 enzim delécióját követően jelentősen károsíthatta a mitokondriális Fe-S klaszterfehérjéket.

Az Fe-S klaszterek és más károsodott mitokondriális fehérjék helyreállítása vagy újraszintézise fokozott transzlációs aktivitást igényelt, amit az $\Delta sod2$ mutánsban a riboszóma fehérje gének fokozott kifejeződése is alátámaszt (20. ábra, S6. és S7. táblázat). Emellett az Fe-S klaszterek újraszintézisének megnövekedett vasigénye jelentős változásokat idézett elő a vasanyagcserében (S7. táblázat). Például a génexpressziós adatok alapján mind a RIA útvonal, mind a sziderofór-közvetített vasfelvételi útvonal gének, valamint az Fe-S klaszterek összeszerelés génjei fokozott kifejeződést mutattak a mutáns törzsben (S7. táblázat). Ugyanakkor a sejtek a vas megőrzése érdekében csökkentették több hemkötő fehérje, illetve nem esszenciális Fe-S klaszter fehérje termelődését is (S7. táblázat). Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy az *A. fumigatus*-nak egyik védelmi rendszere a mitokondriumokat károsító hatásokkal szemben a hatékony vasanyagcsereje. Az $\Delta sod2$ mutáns fokozott érzékenysége a DFP-kezeléssel szemben (9. ábra) szintén alátámasztja a Sod2 szerepét a vastartalmú fehérjék, köztük az Fe-S klaszterek védelmében.

Az *A. fumigatus* túlélése érdekében fontos, hogy megbirkózzon az emberi szervezetben fellépő oxidatív stresszel, különösen a vaslimitált körülmények között, amelyek gyakran előfordulnak fertőzés alatt a szervezetben (Healy és mtsai., 2021). Korábbi kutatások szerint a vashiány fokozza a gomba oxidatív stresszre való érzékenységét (Emri és mtsai., 2024; Kurucz és mtsai., 2018). Érdekes módon azonban a *sod2* gén deléciója önmagában, illetve akár a *sod1*, *sod2* és *sod3* gének együttes eltávolítása sem csökkentette az *A. fumigatus*

virulenciáját immunhiányos egérmodellben vizsgált aspergillózisban (Lambou és mtsai., 2010).

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy az *Aspergillus* nemzetség tagjai kivételes képességgel bírnak a változatos környezeti stresszekhez való alkalmazkodásban, és megerősítik, hogy a csírázás a gombák életciklusának egy kritikus szakasza. Ezért a jövőbeli gombaellenes stratégiák akkor lehetnek hatékonyabbak, ha a csírázó konídiumok elpusztítására összpontosítanak, nem pedig a növekvő hifák leküzdésére (Grahl és mtsai., 2012; Taubitz és mtsai., 2007). Mivel az *A. nidulans*-ban SodB szerepe a mitokondriális funkciók stabilizálásában és a hifák szuperoxid stressz alatti növekedésének támogatásában kisebbnek tűnik a vártnál az általunk használt, glükózt tartalmazó tápközegben, a jövőben a SodB feltételezett szerepét meg kell vizsgálni az *A. nidulans* stacioner fázisban való túlélésében, hasonlóan más korábbi munkákhoz, ahol öregedő élesztő és más fonalas gomba tenyészeteket vizsgáltak (Fabrizio és mtsai., 2003, 2004; Longo és mtsai., 1996; Valle és mtsai., 2022). Eredményeink alapján különösen fontos lenne a *sodB* deléciójának és fokozott expressziójának hatásait részletesen tanulmányozni szénhiányos és szénlimitált *A. nidulans* kultúrák vitalitására és másodlagos anyagcseretermékek termelődésére, különféle omikai technikák alkalmazásával.

Az *A. fumigatus* igen hatékony és alkalmazkodóképes vasanyagcseréjével bír. Érdekességként megjegyzendő, hogy az opportunistá human patogén *Candida albicans* élesztőgombában a *Sod2* ortológia sem volt meghatározó a virulenciában (Hwang és mtsai., 2003), míg a *Cryptococcus neoformans* esetében a Δ *sodB* mutáns teljesen elvesztette a fertőző képességét (Giles és mtsai., 2005). Az *A. fumigatus* Δ *sod2* törzs változatlan virulenciája (Lambou és mtsai., 2010) viszont azt jelentheti, hogy az MnSOD aktivitást célzó gombaellenes terápiák önmagukban valószínűleg nem lennének hatékonyak e faj okozta fertőzések leküzdésére. Azok a kezelések, ahol többféle gombaellenes módszereket alkalmaznak egyidejűleg, elég ígéretesnek tűnnek. Ha például a vasanyagcserét gátló módszereket nézzük, melyet kombinálunk egy másik negatív hatással (Misslinger és mtsai., 2021). A vas hiánya és az MnSOD-aktivitás csökkentése együtt igen erős oxidatív stresszt okozott az *A. fumigatus* sejtjeiben. A jövőben ez a megfigyelés akár a klinikai környezetben is bevezethető gombaellenes módszer kidolgozásának alapja lehet, ahol mindenképpen cél a gomba fertőzőképességének csökkentése és a rezisztencia kialakulásának minimalizálása.

8. KONKLÚZIÓ

Doktori munkámban két fonalas gombával, az *A. nidulans*-szal és *A. fumigatus*-szal végeztem kísérleteket. Bár nem kapcsolódnak közvetlenül az élelmiszeriparhoz vagy a táplálkozáshoz, kutatásuk hozzájárulhat akár élelmiszerbiztonsággal, enzimtechnológiával, táplálkozással összefüggő betegségekkel, élelmiszerallergiával kapcsolatos kérdések megválaszolásához. Továbbá az ilyen jellegű kutatások a fertőzőes megbetegedések elleni küzdelemben is jelentős szerepet játszhatnak. Az *A. nidulans* modellszervezet jó referencia alapot biztosít, kiváló az ipari biotechnológiai folyamatok megértéséhez és fejlesztéséhez. Az *A. fumigatus* egy opportunista humán patogén, mely toxintermelő és potenciális élelmiszerszennyező faj. A velük folyó jelenlegi és újabb kutatások eredményei mindig hasznosak lehetnek a számunkra.

Összefoglalásképpen szeretném felsorolni a doktori munkám célkitűzéseiben feltett kérdésekre adott válaszokat és az újabb tudományos eredményeimet:

1. Az *A. nidulans* és *A. fumigatus* spórák érzékenyebbek voltak az oxidatív stresszre, mint a micéliumok, mert a csírázás közben megnövekedett mitokondriális aktivitásra van szükség, ami eleve fokozott ROS termelést okoz.

2. Az *A. fumigatus* *sod2* gén deléciója jelentősebb változást idézett elő MSB-re adott stresszválaszban, mint az *A. nidulans* *sodB* gén hiánya.

3. *A. nidulans*-ban a *sodB* deléciós mutánsában egyes antioxidáns gének (pl. *sodA*, *catB*-kataláz, peroxidázok) aktivitása megnövekedett, kompenzálva az MnSOD hiányát.

4. Az *A. fumigatus* Δ *sod2* törzsében MSB hatására szintén fokozódott más antioxidáns gének kifejeződése, viszont a további *sod* gének esetében nem történt szignifikáns változás.

5. A stressz hatására az *A. nidulans* törzsek fokozhatták a károsodott mitokondriumaik eltávolítását a transzkriptomikai adatok szerint.

6. Az *A. fumigatus* hatékony vas anyagcseréje segíti az oxidatív stressz túlélését, ezért gátolva a vasfelvételt nagyobb oxidatív stresszérzékenységet figyeltünk meg.

7. Az *A. fumigatus*-ban a *sod2* deléciója érzékenyebbé tette a mutáns törzset M-CSF- és GM-CSF-indukált makrofágokkal szemben.

8. A konídiumok elpusztítását célzó stratégiák hatékonyabbak lehetnek, mint a már növekedésben lévő gombafonalakra kifejlesztett módszerek.

9. MnSOD gátlása szakirodalom szerint önmagában nem hatékony terápiás célpont, de a vasanyagcsere gátlásával kombinálva erősebb oxidatív stresszt váltható ki a gombasejteken.

Ebben a munkában két különböző életmódú fonalas gomba – egy szaprotróf és egy opportunistá humánpatogén faj – oxidatív stressz elleni védekezését hasonlítottuk össze annak mélyebb megértése érdekében. A jövőbeni kutatások során érdemes lenne egy fitopatogén gombafajt is bevonni a vizsgálatba, hogy átfogóbb képet kapjunk arról, hogyan alkalmazkodnak a fonalas gombák ehhez a környezeti stresszformához különböző ökológiai kontextusban.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A fonalas gombák oxidatív stressz elleni védelme igen fontos a túlélésük és az alkalmazkodásuk szempontjából. Ez a stresszforma mindenhol fellelhető, de a patogén fajok a gazdaszervezet immunrendszere által még nagyobb mértékű oxidatív stressznek vannak kitéve. Ezt a stresszformát leginkább a ROS, köztük a $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 és $\cdot OH$ okozzák, melyek felhalmozódva károsítják a sejtek fehérjéit, lipidjeit és DNS-ét. A sejtek integritásának védelmében szükség van hatékony védekezési mechanizmusokra e stresszformával szemben.

A mitokondriumban lokalizált mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) az oxidatív stressz elleni védelem egyik antioxidáns enzime gombákban. A sejten belüli elhelyezkedése miatt a mitokondriumok megfelelő működésének fenntartásában van szerepe. Az elektrontranszport-lánc alatt keletkező szuperoxid anionokat alakítja hidrogén-peroxiddá, melyet majd a védelmi rendszer további tagjai semlegesítenek. Az MnSOD segít fenntartani a sejtek homeosztázisát és megelőzni a sejtkárosodást.

A *sodB* és *sod2* gének MnSOD enzimet kódolnak, melyek a transzkriptomikai elemzéseink szerint is meghatározóak a mitokondriumok védelmében és megfelelő működésük biztosításában. Megfigyeléseink szerint az *A. nidulans* vad típusú és $\Delta sodB$ deléciós mutáns törzsének oxidatív stresszre adott transzkripciós válaszaik hasonlóak voltak. Míg az *A. fumigatus*-ban $\Delta sod2$ mutáns törzsben a stresszre adott válaszok igen eltértek a referencia törzsétől. Eredményeink szerint az oxidatív stressz elleni védelemben a gombák többféle stratégiát is alkalmaznak, ez alapulhat alternatív antioxidáns enzimek génjeinek felülszabályozásán vagy a sérült mitokondriumok hatékonyabb eltávolításán.

Kísérleteinkben, ahol az *A. fumigatus* $\Delta sod2$ mutáns törzset vizsgáltuk, fontos kapcsolatot állapítottunk meg a vas-anyagcsere és oxidatív stressz között. A Sod2 enzim a mitokondriumok Fe-S klaszter fehérjéinek védelmében igen meghatározó. A deléció után a $\Delta sod2$ mutáns igen érzékennyé vált vas-limitált, oxidatív stressznek kitett környezetben. A transzkriptomikai eredményeink szerint MSB hatására a riboszómális és a vasanyagcsere

génjeinek szabályozásában olyan változások léptek fel, melyek valószínűleg a sejtek túlélését segítik.

A humán patogén gombákban, mint az *A. fumigatus*-ban is, igen hatékony védelmi rendszer alakult ki az oxidatív stressz ellen. Szóval, ha figyelembe vesszük, hogy az MnSOD gátlása önmagában nem elég stratégia, de ha kombináljuk vas-anyagcsere gátlással erősebb oxidatív stresszt válthatunk ki. Továbbá azt is megfigyeltük kísérleteinkben, hogy a csírázás előtti konídiumokat célzó stratégiák jóval hatékonyabbak lehetnek, mint a csírázás utáni negatív hatások. Ezen kombinációk figyelembevétele hasznosak lehetnek a jövőben a gomba ellenes stratégiák fejlesztésénél.

10. SUMMARY

Protection of filamentous fungi against oxidative stress is very important for their survival and adaptation. This form of stress is ubiquitous, but pathogenic species are subjected to even higher levels of oxidative stress by the host immune system. Oxidative stress is mainly caused by ROS, including $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and $\cdot OH$, which damage cellular proteins, lipids and DNA after accumulation. Effective defence mechanisms against this form of stress are needed to protect cell integrity.

Manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD), localized in the mitochondria, is an antioxidant enzyme in fungi that protects against oxidative stress. Because of its intracellular location, it plays a role in maintaining proper mitochondrial function. It converts superoxide anions generated during the electron transport chain into hydrogen peroxide, which is then neutralised by other members of the defence system. MnSOD helps maintain cellular homeostasis and prevent cell damage.

The *sodB* and *sod2* genes encode the MnSOD enzyme, which our transcriptomic analyses show to be crucial in protecting mitochondria and ensuring their proper function. We observed that the transcriptional responses of wild-type and Δ *sodB* deletion mutant strains of *A. nidulans* to oxidative stress were similar. While in the Δ *sod2* mutant strain of *A. fumigatus*, the stress responses were very different from those of the control strain. Our results suggest that fungi may employ multiple strategies to protect against oxidative stress, which may be based on upregulation of alternative antioxidant enzyme genes or more efficient removal of damaged mitochondria.

In our experiments with the Δ *sod2* mutant strain of *A. fumigatus*, we found an important link between iron metabolism and oxidative stress. The Sod2 enzyme is crucial for the

protection of Fe-S cluster proteins in mitochondria. After deletion, the *Δsod2* mutant became highly sensitive to oxidative stress on iron-limited media. Our transcriptomic results suggest that MSB induces changes in the regulation of ribosomal and iron metabolism genes that are likely to promote cell survival.

In human pathogenic fungi, such as *A. fumigatus*, a very effective defence system against oxidative stress has been developed. So, if we consider that inhibition of MnSOD alone is not a sufficient strategy, but when combined with inhibition of iron metabolism, we can induce a stronger oxidative stress. Furthermore, we observed in our experiments that strategies targeting conidia before germination can be much more effective than attacks after germination. Consideration of these combinations may be useful for the development of antifungal strategies in the future.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams, T. H., Wieser, J. K., Yu, J.H. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
2. Almansa, M. S., Palma, J. M., Yáñez, J., Del Río, L. A., Sevilla, F. (1991). Purification of an Iron-Containing Superoxide Dismutase from A Citrus Plant, Citrus Limonum R. *Free Radical Research Communications*, 12(1), 319–328. <https://doi.org/10.3109/10715769109145801>
3. Altenburger, A., Bender, M., Ekelund, F., Elmholt, S., Jacobsen, C. S. (2014). Steam-treatment-based soil remediation promotes heat-tolerant, potentially pathogenic microbiota. *Environmental Technology*, 35(6), 773–780. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.850520>
4. Antal, K., Gila, B. C., Pócsi, I., Emri, T. (2020). General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? *Fungal Biology*, 124(5), 376–386. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2019.10.009>
5. *Aspergillus Genome Projects | Broad Institute.* forrás <https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/aspergillus-genome-projects>
6. Aung-Htut, M. T., Ayer, A., Breitenbach, M., Dawes, I. W. (2011). Oxidative Stresses and Ageing. *Sub-Cellular Biochemistry*, 57, 13–54. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2561-4_2
7. Balázs, A., Pócsi, I., Hamari, Z., Leiter, É., Emri, T., Miskei, M., Oláh, J., Tóth, V., Hegedűs, N., Prade, R. A., Molnár, M., Pócsi, I. (2010). AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(3), 289–303. <https://doi.org/10.1007/S00438-010-0513-Z>
8. Barratt, R. W., Johnson, G. B., Ogata, W. N. (1965). Wild-Type and Mutant Stocks of ASPERGILLUS NIDULANS. *Genetics*, 52(1), 233. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/52.1.233>
9. Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N. (2007). Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 506–515. <https://doi.org/10.1134/S0003683807050031>
10. Benzie, I. F. F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39(2), 53–61. <https://doi.org/10.1007/S003940070030>
11. Berdoukas, V., Farmaki, K., Carson, S., Wood, J., Coates, T. (2012). Treating thalassemia major-related iron overload: the role of deferiprone. *Journal of Blood Medicine*, 2012, 119. <https://doi.org/10.2147/JBM.S27400>
12. Bhabhra, R., Askew, D. S. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: Role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology*, 43(SUPPL.1), S87–S93. <https://doi.org/10.1080/13693780400029486>

13. Blatzer, M., Binder, U., Haas, H. (2011). The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genetics and Biology*, 48(11), 1027–1033. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2011.07.009>
14. Boczonádi, I., Török, Z., Jakab, Á., Kónya, G., Gyurcsó, K., Baranyai, E., Szoboszlai, Z., Dönczö, B., Fábíán, I., Leiter, É., Lee, M. K., Csernoch, L., Yu, J. H., Kertész, Z., Emri, T., Pócsi, I. (2020). Increased Cd²⁺ biosorption capability of *Aspergillus nidulans* elicited by *crpA* deletion. *Journal of Basic Microbiology*, 60(7), 574–584. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202000112>
16. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
17. Bradshaw RE., Bird DM., Brown S., Gardiner RE., Hirst P. (2001). Cytochrome c is not essential for viability of the fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics*, 266(1), 48-55. doi: 10.1007/s004380100517
18. Brandon, M., Howard, B., Lawrence, C., Laubenbacher, R. (2015a). Iron acquisition and oxidative stress response in *aspergillus fumigatus*. *BMC Systems Biology*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12918-015-0163-1>
19. Bruder Nascimento, A. C. M. de O., dos Reis, T. F., de Castro, P. A., Hori, J. I., Bom, V. L. P., de Assis, L. J., Ramalho, L. N. Z., Rocha, M. C., Malavazi, I., Brown, N. A., Valiante, V., Brakhage, A. A., Hagiwara, D., Goldman, G. H. (2016). Mitogen activated protein kinases SakAHOG1 and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Molecular Microbiology*, 100(5), 841–859. <https://doi.org/10.1111/MMI.13354>
20. Bugli, F., Sterbini, F. P., Cacaci, M., Martini, C., Lancellotti, S., Stigliano, E., Torelli, R., Arena, V., Caira, M., Posteraro, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B. (2014). Increased production of gliotoxin is related to the formation of biofilm by *Aspergillus fumigatus*: an immunological approach. *Pathogens and Disease*, 70(3), 379–389. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12152>
21. Carter, W. O., Naryanan, P. K., Robinson, J. P. (1994). Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(2), 253–258. <https://doi.org/10.1002/JLB.55.2.253>
22. Case, A. J. (2017). On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants 2017*, Vol. 6, Page 82, 6(4), 82. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX6040082>
23. Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 949–962. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00090-3)
24. Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*, 113(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0926-6593\(66\)80120-0](https://doi.org/10.1016/S0926-6593(66)80120-0)
25. Cui, H., Kong, Y., Zhang, H. (2011). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 646354. <https://doi.org/10.1155/2012/646354>

26. Dagenais, T. R. T., Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3), 447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>
27. Dantas, A. D. S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., Quinn, J. (2015). Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* 2015, Vol. 5, Pages 142-165, 5(1), 142–165. <https://doi.org/10.3390/BIOM5010142>
28. Dickinson, B. C., Chang, C. J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature chemical biology*, 7(8), 504–511. <https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.607>
29. Dijksterhuis, J. (2019). Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food microbiology*, 81, 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.11.006>
30. Dores, R. M., McDonald, L. K., Steveson, T. C., Sei, C. A. (1990). The molecular evolution of neuropeptides: prospects for the '90s. *Brain, behavior and evolution*, 36(2–3), 80–99. <https://doi.org/10.1159/000115300>
31. Drummond, R. A., Gaffen, S. L., Hise, A. G., Brown, G. D. (2015). Innate defense against fungal pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6), 1–19. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019620>
32. Emri, T., Antal, K., Varga, K., Gila, B. C., Pócsi, I. (2024). The Oxidative Stress Response Highly Depends on Glucose and Iron Availability in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 10(3), 221. <https://doi.org/10.3390/JOF10030221/S1>
33. Emri, T., Sümegi-Györi, V. M., Páll, K., Gila, B. C., Pócsi, I. (2022). Effect of the combinatorial iron-chelation and oxidative stress on the growth of *Aspergillus* species. *Research in Microbiology*, 173(8). <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2022.103969>
34. Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H. S., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1705-Z>
35. Emri, T., Vékony, V., Gila, B., Nagy, F., Forgács, K., Pócsi, I. (2018). Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 63(5), 619–626. <https://doi.org/10.1007/S12223-018-0601-8>
36. Enright, A. J., Van Dongen, S., Ouzounis, C. A. (2002). An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Research*, 30(7), 1575–1584. <https://doi.org/10.1093/NAR/30.7.1575>
37. Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., Diaspro, A., Valentine, J. S., Gralla, E. B., Longo, V. D. (2003). SOD2 Functions Downstream of Sch9 to Extend Longevity in Yeast. *Genetics*, 163(1), 35–46. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/163.1.35>
38. Fabrizio, P., Pletcher, S. D., Minois, N., Vaupel, J. W., Longo, V. D. (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 557(1–3), 136–142. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01462-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01462-5)

39. Fortwendel, J. R., Panepinto, J. C., Seitz, A. E., Askew, D. S., Rhodes, J. C. (2004). *Aspergillus fumigatus* rasA and rasB regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2), 129–139. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2003.10.004>
40. Frealle, E., Aliouat-Denis, C.-M., Delhaes, L., Hot, D., Dei-Cas, E. (2013). Transcriptomic Insights into the Oxidative Response of Stress-Exposed *Aspergillus fumigatus*. *Current Pharmaceutical Design*, 19(20), 3713–3737. <https://doi.org/10.2174/1381612811319200011>
41. Fréal, E., Noël, C., Nolard, N., Symoens, F., Felipe, M. S., Dei-Cas, E., Camus, D., Viscogliosi, E., Delhaes, L. (2006). Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2006.05.001>
42. Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants Redox Signaling*, 15(6), 1583. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.3999>
43. Furukawa, T., Yoshinari, T., Sakuda, S. (2017). Intracellular superoxide level controlled by manganese superoxide dismutases affects trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(21). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX213>
44. Gasch, A. P. (2003). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. *Yeast Stress Responses*, 11–70. https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_2
45. Ghazawi, K. F., Fatani, S. A., Mohamed, S. G. A., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M. (2023). *Aspergillus nidulans*—Natural Metabolites Powerhouse: Structures, Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnological Potential. *Fermentation*, 9(4), 325. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION9040325>
46. Giles, SS., Batinić-Haberle, I., Perfect, JR., Cox GM., (2005). *Cryptococcus neoformans* Mitochondrial Superoxide Dismutase: an Essential Link between Antioxidant Function and High-Temperature Growth. *ASM Journals, Eukaryotic Cell*, 4(1), 46–54. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.46-54.2005>
47. Glickstein, H., El, R. Ben, Shvartsman, M., Cabantchik, Z. I. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood*, 106(9), 3242–3250. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-02-0460>
48. Goffart, S., Tikkanen, P., Michell, C., Wilson, T., Pohjoismäki, J. L. O. (2021). The type and source of reactive oxygen species influences the outcome of oxidative stress in cultured cells. *Cells*, 10(5), 1075. <https://doi.org/10.3390/CELLS10051075/S1>
49. Grahl, N., Dinamarco, T. M., Willger, S. D., Goldman, G. H., Cramer, R. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Molecular microbiology*, 84(2), 383–399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08034.x>

50. Grant, C. M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39(3), 533–541. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02283.X>
51. Haas, H. (2012). Iron - a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, 3(28). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00028/>
52. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780198717478.001.0001>
53. Hallsworth, J. E., Magan, N. (1995). Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 141(5), 1109–1115. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1109>
54. He, X-J., Fassler, J. S. (2005). Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1454–1467. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04917.X>
55. Healy, C., Munoz-Wolf, N., Strydom, J., Faherty, L., Williams, N. C., Kenny, S., Donnelly, S. C., Cloonan, S. M. (2021). Nutritional immunity: the impact of metals on lung immune cells and the airway microbiome during chronic respiratory disease. *Respiratory Research*, 22(1), 1–44. <https://doi.org/10.1186/S12931-021-01722-Y>
56. Herrera-Mozo, I., Ferrer, B., Rodriguez-Sanchez, J. L., Juarez, C. (2006). Description of a novel panallergen of cross-reactivity between moulds and foods. *Immunological investigations*, 35(2), 181–197. <https://doi.org/10.1080/08820130600616599>
57. Hwang, C. S., Baek, Y. U., Yim, H. S., Kang, S. O. (2003). Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast*, 20(11), 929–941. <https://doi.org/10.1002/YEA.1004>
58. Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1073–1082. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05028.X>
59. Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-91>
60. Jackson, S. M. J., Cooper, J. B. (1998). An analysis of structural similarity in the iron and manganese superoxide dismutases based on known structures and sequences. *BioMetals*, 11(2), 159–173. <https://doi.org/10.1023/A:1009238214394>
61. Jia, L. J., Rafiq, M., Radosa, L., Hortschansky, P., Cunha, C., Cseresnyés, Z., Krüger, T., Schmidt, F., Heinekamp, T., Straßburger, M., Löffler, B., Doenst, T., Lacerda, J. F., Campos, A., Figge, M. T., Carvalho, A., Kniemeyer, O., Brakhage, A. A. (2023). *Aspergillus fumigatus* hijacks human p11 to redirect fungal-containing phagosomes to non-degradative pathway. *Cell Host and Microbe*, 31(3), 373–388.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2023.02.002>

62. Karányi, Z., Holb, I., Hornok, L., Pócsi, I., Miskei, M. (2013). FSRD: fungal stress response database. *Database*, <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAT037>
63. Keller, N. P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T. D., Burow, G. B. (2007). pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, *87*(6), 643–648. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.643>
64. Kim, Y. J., Yeong Man, Y., Maeng, P. J. (2017). Differential Control of Asexual Development and Sterigmatocystin Biosynthesis by a Novel Regulator in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep46340>
65. Knuppertz, L., Warnsmann, V., Hamann, A., Grimm, C., Osiewacz, H. D. (2017). Stress-dependent opposing roles for mitophagy in aging of the ascomycete *Podospira anserina*. *Autophagy*, *13*(6), 1037–1052. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1303021>
66. Kocsis, B., Lee, M. K., Antal, K., Yu, J. H., Pócsi, I., Leiter, É., Emri, T. (2023). Genome-Wide Gene Expression Analyses of the AtfA/AtfB-Mediated Menadione Stress Response in *Aspergillus nidulans*. *Cells*, *12*(3), 463. <https://doi.org/10.3390/CELLS12030463/S1>
67. Kocsis, B., Lee, M. K., Yu, J. H., Nagy, T., Daróczi, L., Batta, G., Pócsi, I., Leiter, É. (2022). Functional analysis of the bZIP-type transcription factors AtfA and AtfB in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* *13*:1003709. doi: 10.3389/fmicb.2022.1003709
68. Kontoghiorghes, G. J. (2023). The Vital Role Played by Deferiprone in the Transition of Thalassaemia from a Fatal to a Chronic Disease and Challenges in Its Repurposing for Use in Non-Iron-Loaded Diseases. *Pharmaceuticals*, *16*(7), 1016. <https://doi.org/10.3390/PH16071016>
69. Kumar, A. (2020). *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. *International Journal of Microbiology*, *2020*(1), 8894215. <https://doi.org/10.1155/2020/8894215>
70. Kurucz, V., Krüger, T., Antal, K., Dietl, A. M., Haas, H., Pócsi, I., Kniemeyer, O., Emri, T. (2018). Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron depletion. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12864-018-4730-X>
71. Lalève, A., Vallières, C., Golinelli-Cohen, M. P., Bouton, C., Song, Z., Pawlik, G., Tindall, S. M., Avery, S. V., Clain, J., Meunier, B. (2016). The antimalarial drug primaquine targets Fe–S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biology*, *7*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2015.10.008>
72. Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., Latge, J. P. (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, *75*(4), 910–923. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.07024.X>
73. Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular Microbiology*, *80*(2), 436–454. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07581.X>

74. Latgé, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology*, 9(8), 382–389. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02104-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02104-7)
75. Leal, S. M., Roy, S., Vareechon, C., Carrion, S. de J., Clark, H., Lopez-Berges, M. S., diPietro, A., Schrettl, M., Beckmann, N., Redl, B., Haas, H., Pearlman, E. (2013). Targeting Iron Acquisition Blocks Infection with the Fungal Pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. *PLOS Pathogens*, 9(7), e1003436. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003436>
76. Leal, S. M., Vareechon, C., Cowden, S., Cobb, B. A., Latgé, J. P., Momany, M., Pearlman, E. (2012). Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2482–2498. <https://doi.org/10.1172/JCI63239>
77. Leiter, E., Park, H. S., Kwon, N. J., Han, K. H., Emri, T., Olah, V., Meszaros, I., Dienes, B., Vincze, J., Csernoch, L., Yu, J. H., Pocs, I. (2016). Characterization of the aodA, dnmA, mnSOD and pimA genes in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep20523>
78. Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., Brakhage, A. A. (2007). The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2290–2302. <https://doi.org/10.1128/EC.00267-07>
79. Lewis, R. E., Wiederhold, N. P., Lionakis, M. S., Prince, R. A., Kontoyiannis, D. P. (2005). Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6120–6122. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6120-6122.2005>
80. Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms*, 5(3), 37. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030037>
81. Linz, J. E., Hong, S. Y., Roze, L. V. (2013). Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins*, 5(4), 683–702. <https://doi.org/10.3390/TOXINS5040683>
82. Long, N., Xu, X., Qian, H., Zhang, S., Lu, L. (2016). A putative mitochondrial iron transporter MrsA in *Aspergillus fumigatus* plays important roles in azole-, oxidative stress responses and virulence. *Frontiers in Microbiology*, 7:716. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00716>
83. Longo, V. D., Gralla, E. B., Valentine, J. S. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12275–12280. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.21.12275>
84. Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 153(2), 175–190. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2010.10.004>

85. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2014.10.016>
86. Mahata, P. K., Dass, R. S., Gunti, L., Thorat, P. A. (2022). First report on the metabolic characterization of Sterigmatocystin production by select *Aspergillus* species from the Nidulantes section in *Foeniculum vulgare*. *Frontiers in Microbiology*, 13:958424. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.958424>
87. Martinelli, S. D. (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Progress in Industrial Microbiology*, 29, 33–58. <https://europepmc.org/article/med/7765132>
88. Misslinger, M., Hortschansky, P., Brakhage, A. A., Haas, H. (2021). Fungal iron homeostasis with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(1), 118885. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118885>
89. Misslinger, M., Lechner, B. E., Bacher, K., Haas, H. (2018). Iron-sensing is governed by mitochondrial, not by cytosolic iron–sulfur cluster biogenesis in *Aspergillus fumigatus*. *Metallomics*, 10(11), 1687–1700. <https://doi.org/10.1039/C8MT00263K>
90. Molnár, Á. P., Németh, Z., Fekete, E., Flipphi, M., Keller, N. P. Karaffa, L. (2018). Analysis of the relationship between alternative respiration and sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*. *Toxins*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS10040168>
91. Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M. N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2013). The bZIP Transcription Factor Fgap1 Mediates Oxidative Stress Response and Trichothecene Biosynthesis But Not Virulence in *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE*, 8(12), e83377. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083377>
92. Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 295–308. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829416>
93. Muid, K. A., Karakaya, H. Ç., Koc, A. (2014). Absence of superoxide dismutase activity causes nuclear DNA fragmentation during the aging process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(2), 260–263. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.01.056>
94. Mulford, K. E., Fassler, J. S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10(6), 761–769. <https://doi.org/10.1128/EC.00328-10>
95. Munster, J. M. van, Burggraaf, A.-M., Pocsi, I., Szilágyi, M., Emri, T., Ram, A. F. J. (2016). Post-genomic Approaches to Dissect Carbon Starvation Responses in *Aspergilli*. *Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era*, 89–112. <https://doi.org/10.21775/9781910190395.06>
96. Narasipura, S. D., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S. (2005). Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Molecular Microbiology*, 55(6), 1782–1800. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04503.X>

97. Nazik, H., Penner, J. C., Ferreira, J. A., Haagensen, J. A. J., Cohen, K., Spormann, A. M., Martinez, M., Chen, V., Hsu, J. L., Clemons, K. V., Stevens, D. A. (2015). Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 6514–6520. <https://doi.org/10.1128/AAC.01684-15>
98. Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., Brown, A. J. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>
99. Novodvorska, M., Hayer, K., Pullan, S. T., Wilson, R., Blythe, M. J., Stam, H., Stratford, M., Archer, D. B. (2013). Transcriptional landscape of *Aspergillus niger* at breaking of conidial dormancy revealed by RNA-sequencing. *BMC Genomics*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-246>
100. Ntana, F., Mortensen, U. H., Sarazin, C., Figge, R. (2020). *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform. *Catalysts*, *10*(9), 1064. <https://doi.org/10.3390/CATAL10091064>
101. Oberle, M., Reichmuth, M., Laffer, R., Ottiger, C., Fankhauser, H., Bregenzer, T. (2015). Non-Seasonal Variation of Airborne *Aspergillus* Spore Concentration in a Hospital Building. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(11), 13730–13738. <https://doi.org/10.3390/IJERPH121113730>
102. Oberley, L. W., Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in Enzymology*, *105*(C), 457–464. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3)
103. O'Brien, E. M., Dirmeier, R., Engle, M., Poyton, R. O. (2004). Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 51817–51827. <https://doi.org/10.1074/JBC.M405958200>
104. Ogata, T., Senoo, T., ... S. K.-C. B., 2016, undefined. (2015). Mitochondrial superoxide dismutase deficiency accelerates chronological aging in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Wiley Online Library*, *40*(1), 100–106. <https://doi.org/10.1002/cbin.10556>
105. Orosz, E., Antal, K., Gazdag, Z., Szabó, Z., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T. (2017). Transcriptome-Based Modeling Reveals that Oxidative Stress Induces Modulation of the AtfA-Dependent Signaling Networks in *Aspergillus nidulans*. *International Journal of Genomics*, *2017*(1), 6923849. <https://doi.org/10.1155/2017/6923849>
106. Osiewacz, H. D. (2002). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Research Reviews*, *1*(3), 425–442. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(02\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(02)00010-7)
107. Parekh, H., Chavan, S., Chitnis, M. (1991). Modulation of thiol pools by vitamin K3 and its effect on survival of sensitive and resistant murine tumor cells. *Anti-cancer drugs*, *2*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1097/00001813-199104000-00006>

108. Paterson, R. R. M., Lima, N. (2017). Filamentous Fungal Human Pathogens from Food Emphasising *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. *Microorganisms*, 5(3), 44. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030044>
109. Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., Rediers, H., Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 296–322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>
110. Pócsi, I., Prade, R. A., Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
111. Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Fernandes, É. K. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), 383–404. <https://doi.org/10.1007/S00294-015-0477-Y>
112. Rangel, D. E. N., Fernandes, É. K. K., Braga, G. U. L., Roberts, D. W. (2011). Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 315(2), 81–86. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2010.02168.X>
113. Reverberi, M., Punelli, M., Scala, V., Scarpari, M., Uva, P., Mentzen, W. I., Dolezal, A. L., Woloshuk, C., Pinzari, F., Fabbri, A. A., Fanelli, C., Payne, G. A. (2013). Genotypic and Phenotypic Versatility of *Aspergillus flavus* during Maize Exploitation. *PLOS ONE*, 8(7), e68735. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0068735>
114. Saffer, C., Timme, S., Rudolph, P., Figge M.T. M. (2023). Surrogate infection model predicts optimal alveolar macrophage number for clearance of *Aspergillus fumigatus* infections. *npj Syst Biol Appl*, 9(12). <https://doi.org/10.1038/s41540-023-00272-x>
115. Sass, G., Ansari, S. R., Dietl, A. M., Déziel, E., Haas, H., Stevens, D. A. (2019). Intermicrobial interaction: *Aspergillus fumigatus* siderophores protect against competition by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 14(5), e0216085. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216085>
116. Scheckhuber, C. Q., Mitterbauer, R., Osiewacz, H. D. (2009). Molecular basis of and interference into degenerative processes in fungi: potential relevance for improving biotechnological performance of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 27–35. <https://doi.org/10.1007/S00253-009-2205-3>
117. Scheckhuber, C. Q., Rödel, E., Wüsthube, J. (2008). Regulation of mitochondrial dynamics--characterization of fusion and fission genes in the ascomycete *Podospira anserina*. *Biotechnology journal*, 3(6), 781–790. <https://doi.org/10.1002/BIOT.200800010>
118. Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst, H. N., Haynes, K., Haas, H. (2007). Distinct Roles for Intra- and Extracellular Siderophores during *Aspergillus fumigatus* Infection. *PLOS Pathogens*, 3(9), e128. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0030128>

119. Schrettl, M., Haas, H. (2011). Iron homeostasis—Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), 400–405. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.06.002>
120. Schrettl, M., Kim, H. S., Eisendle, M., Kragl, C., Nierman, W. C., Heinekamp, T., Werner, E. R., Jacobsen, I., Illmer, P., Yi, H., Brakhage, A. A., Haas, H. (2008). SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 70(1), 27–43. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2008.06376.X>
121. Shao, H., Tu, Y., Wang, Y., Jiang, C., Ma, L., Hu, Z., Wang, J., Zeng, B., He, B. (2019). Oxidative Stress Response of *Aspergillus oryzae* Induced by Hydrogen Peroxide and Menadione Sodium Bisulfite. *Microorganisms*, 7(8), 225. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7080225>
122. Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., Höfer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms--I. Microbial vs. higher cells--damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia microbiologica*, 44(6), 587–624. <https://doi.org/10.1007/BF02825650>
123. Weisiger, R.A., Fridovich, I. (1973). Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 248(10), 3582–3592. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43969-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43969-0)
124. Stenberg, S., Li, J., Gjuvslund, A. B., Persson, K., Demitz-Helin, E., Gonzalez-Pena, C., Yue, J. X., Gilchrist, C., Årengård, T., Ghiaci, P., Larsson-Berglund, L., Zackrisson, M., Smits, S., Hallin, J., Höög, J. L., Molin, M., Liti, G., Omholt, S. W., Warringer, J. (2022). Genetically controlled mtDNA deletions prevent ROS damage by arresting oxidative phosphorylation. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76095>
125. Sterea, A. M., El Hiani, Y. (2020). The Role of Mitochondrial Calcium Signaling in the Pathophysiology of Cancer Cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 1131, 747–770. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_30
126. Stuart, G. R., Humble, M. M., Strand, M. K., Copeland, W. C. (2009). Transcriptional response to mitochondrial NADH kinase deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*, 9(3), 211–221. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2009.02.004>
127. Szabó, Z., Pákozdi, K., Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, A. F., Emri, T., Ádám, A. L., Leiter, É., Hornok, L., Pócsi, I. (2020). FvatfA regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(18), 7879–7899. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10717-6>
128. Taha, M. P. M., Pollard, S. J. T., Sarkar, U., Longhurst, P. (2005). Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: Feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Management*, 25(4), 445–450. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2005.02.013>
129. Tan, S. X., Teo, M., Lam, Y. T., Dawes, I. W., Perrone, G. G. (2009). Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 20(5), 1493–1508. <https://doi.org/10.1091/MBC.E08-07-0697>

130. Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., Ebel, F. (2007). Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Current Microbiology*, 54(5), 354–360. <https://doi.org/10.1007/S00284-006-0413-Y>
131. Temple, M. D., Perrone, G. G., Dawes, I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in cell biology*, 15(6), 319–326. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2005.04.003>
132. Theobald, S., Vesth, T., Nybo, J. L., Frisvad, J. C., Kjærboelling, I., Mondo, S., LaButti, K., Haridas, S., Riley, R., Kuo, A. A., Salamov, A. A., Pangilinan, J., Lipzen, A., Koriabine, M., Yan, M., Barry, K., Clum, A., Lyhne, E. K., Drula, E., Andersen, M. R. (2025). Comparative genomics of *Aspergillus nidulans* and section Nidulantes. *Current Research in Microbial Sciences*, 8, 100342. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2025.100342>
133. Stromájer-Rácz, T (2013). A *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő sejtjeiben lejátszódó oxidatív stresszfolyamatok vizsgálata. <http://pea.lib.pte.hu/handle/pea/5541>
134. Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D. (2003). *Oxidative stress responses in yeast*. 241–303. https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_6
135. Tomee, J. F. C., Kauffman, H. F. (2000). Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical Experimental Allergy*, 30(4), 476–484. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2222.2000.00796.X>
136. Chomczynski, P., Simms, D. M., Cizdziel, P.E. (1993). *TRIzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA*. *Focus*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=211656e2-1673-4783-8402-d8f5f5332811>
137. Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(3), 426–431. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.11.088>
138. Valle, A., Scheckhuber, C. Q., De Obeso Fernandez Del Valle, A., Scheckhuber, C. Q. (2022). Superoxide Dismutases in Eukaryotic Microorganisms: Four Case Studies. *Antioxidants*, 11(2), 188. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11020188>
139. Van Dongen, S. (2008). Graph Clustering Via a Discrete Uncoupling Process. *SIAM Journal on Matrix Analysis and Applications*, 30(1), 121–141. <https://doi.org/10.1137/040608635>
140. van Leeuwen, M. R., Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H. A. B., Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74, 59–70. <https://doi.org/10.3114/SIM0009>
141. van Munster, J. M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S. T., Blythe, M. J., Malla, S., Kokolski, M., Noltorp, E. C. M., Wennberg, K., Fetherston, R., Beniston, R., Yu, X., Dupree, P., Archer, D. B. (2014). The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 34. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2014.04.006>
142. van Munster, J. M., Dobruchowska, J. M., Veloo, R., Dijkhuizen, L., van der Maarel, M. J. E. C. (2015). Characterization of the starvation-induced chitinase CfcA and α -1,3-

glucanase AgnB of *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(5), 2209–2223. <https://doi.org/10.1007/S00253-014-6062-3>

143. Verburg, K., van Neer, J., Duca, M., de Cock, H. (2022). Novel Treatment Approach for Aspergilloses by Targeting Germination. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/JOF8080758>

144. Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2005). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1677–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>

145. Von Bank, H., Hurtado-Thiele, M., Oshimura, N., Simcox, J. (2021). Mitochondrial Lipid Signaling and Adaptive Thermogenesis *Metabolites*, 11(2), 124. <https://doi.org/10.3390/METABO11020124>

146. Xie, X-Q., Li, F., Ying, S-H., Feng, M-G., (2012). Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. *Plos one*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030298>

147. Yaakoub, H., Mina, S., Calenda, A., Bouchara, J. P., Papon, N. (2022). Oxidative stress response pathways in fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022 79:6, 79(6), 1–27. <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04353-8>

148. Yaakov, D. Ben, Shadkchan, Y., Albert, N., Kontoyiannis, D. P., Osherov, N. (2017). The quinoline bromoquinol exhibits broad-spectrum antifungal activity and induces oxidative stress and apoptosis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2263–2272. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX117>

149. Ye, W., Liu, T., Zhang, W., Zhang, W. (2021). The Toxic Mechanism of Gliotoxins and Biosynthetic Strategies for Toxicity Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13510. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413510>

150. Zhu, X. G., Tong, S. M., Ying, S. H., Feng, M. G. (2018). Antioxidant activities of four superoxide dismutases in *Metarhizium robertsii* and their contributions to pest control potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), 9221–9230. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9302-0>

152. Zintel, S., Schwitalla, D., Luce, K., Hamann, A., Osiewacz, H. D. (2010). Increasing mitochondrial superoxide dismutase abundance leads to impairments in protein quality control and ROS scavenging systems and to lifespan shortening. *Experimental gerontology*, 45(7–8), 525–532. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2010.01.006>

153. Zyrina, A. N., Smirnova, E. A., Markova, O. V., Severin, F. F., Knorre, D. A. (2017). Mitochondrial superoxide dismutase and Yap1p act as a signaling module contributing to ethanol tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02759-16>



Nyilvántartási szám: DEENK/127/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pákozdi Klaudia

Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

MTMT azonosító: 10073393

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pákozdi, K.**, Antal, K., Pázmándi, K. L., Miskei, M., Szabó, Z., Pócsi, I., Emri, T.: Resynthesis of Damaged Fe-S Cluster Proteins Protects *Aspergillus fumigatus* Against Oxidative Stress in the Absence of Mn-Superoxide Dismutase.
J. Fungi. 10, 1-16, 2024.
DOI: <https://doi.org/10.3390/jof10120823>
IF: 4.2 (2023)
2. **Pákozdi, K.**, Emri, T., Antal, K., Pócsi, I.: Global Transcriptomic Changes Elicited by sodB Deletion and Menadione Exposure in *Aspergillus nidulans*.
J. Fungi. 9 (11), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9111060>
IF: 4.2





További közlemények

3. Leiter, É., Emri, T., **Pákozdi, K.**, Hornok, L., Pócsi, I.: The impact of bZIP Atf1 ortholog global regulators in fungi.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 5769-5783, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11431-7>
IF: 5.56
4. Szabó, Z., **Pákozdi, K.**, Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, A. F., Emri, T., Ádám, A. L., Leiter, É., Hornok, L., Pócsi, I.: FvafA regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 104 (18), 7879-7899, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10717-6>
IF: 4.813
5. Szabó, Z., **Pákozdi, K.**, Murvai, K., Kecskeméti, Á., Oláh, V., Logrieco, A. F., Madar, A., Dienes, B., Csernoch, L., Emri, T., Hornok, L., Pócsi, I., Leiter, É.: FvmsSOD is involved in oxidative stress defence, mitochondrial stability and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*.
J. Basic Microbiol. 60 (11-12), 994-1003, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000560>
IF: 2.281

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,054

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
8,4**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.04.02.



12. TÁRGYSZAVAK

Aspegillus nidulans, *Aspegillus fumigatus*, MnSOD, *sodB*, *sod2*, oxidatív stressz, vas anyagcsere, RNS szekvenálás

Aspegillus nidulans, *Aspegillus fumigatus*, MnSOD, *sodB*, *sod2*, oxidative stress, iron metabolism, RNA sequencing

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Pócsi István egyetemi tanárnak a szakmai útmutatást, és hogy lehetővé tette számomra a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken a doktori munkám elkészítését. Külön köszönettel tartozom, hogy több, a Tanszéken folyó munkába is betekintést nyerhettem, valamint az érdekes és fontos kérdéseket felvető témám kidolgozásában nyújtott segítségéért, amely lehetőséget adott számomra, hogy egy aktuális problémát boncolgató kutatásban vehessek részt.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Emri Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy szakmai segítséget nyújtott a transzkripciós vizsgálatokban, az RT-qPCR kísérletek elvégzésében, kiértékelésében és a statisztikai analízisben. Az *Aspergillus* törzsekkel folyó munkálatokban szerzett magasfokú szakmai tapasztalatával mindig fordulhattam hozzá tanácsért.

Szeretném megköszönni Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek, hogy rendelkezésemre bocsátotta az *Aspergillus nidulans* deléciós törzset, valamint mindig készségesen segített, ha bármi kérdésem felmerült.

Köszönettel tartozom Prof Dr. Jean-Paul Latge professzor úrnak (Unité des Aspergillus, Institut Pasteur, Párizs, Franciaország), hogy az *A. fumigatus akub^{ku80}* és $\Delta sod2$ törzsét rendelkezésemre bocsátotta.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Antal Károly főiskolai docensnek (EKE TTK Állattani Tanszék) a bioinformatikai elemzésekben nyújtott segítségéért, a statisztikai kiértékeléseiért, a referencia genomokra történő illesztéséért és az illesztett readok számának meghatározásáért.

Szeretném megköszönni Dr. Pázmándi Kitti Lillának egyetemi adjunktusnak (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Immunológiai Intézet) a makrofág kísérletben való segítségét.

További köszönettel tartozom Dr. Miskei Márton tudományos főmunkatársnak az *Aspergillus fumigatus* af293 és *akub^{ku80}* törzsek génjei közötti ortológia meghatározásáért.

Szeretném megköszönni továbbá Dr. Szabó Zsuzsának a transzkriptomikai optimalizálásban és RNS izolálásban nyújtott segítségét.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztens stresszvizsgálatokban és a labori munkákban nyújtott segítségét, gyakorlati tapasztalatának megosztását.

Doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH, Magyarország) támogatásával valósult meg a K131767,

K137678 és NN125671 számú projektek keretében. A TKP2021-EGA-20 számú projekt a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásával, a TKP2021-EGA finanszírozási program keretében valósult meg, amelyet a Magyarország Kulturális és Innovációs Minisztériuma biztosított. A projekt továbbá a HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat finanszírozásában részesült.

14. MELLÉKLETEK

Kiegészítő táblázatok, melyek alapjául szolgálnak az értekezésnek, terjedelmük miatt online formátumban, az eredeti publikációkban érhetőek el.

Az *A. nidulans* kísérletek eredményeit kiegészítő táblázatok:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof9111060/s1>

S1. táblázat (Table S1): A kiválogatott gének RT-qPCR adatai.

S2. táblázat (Table S2): A korreláció bemutatása az RNS-seq és DNS-chip adatai között.

S3. táblázat (Table S3): A génkészlet- dúsulási elemzés eredményei.

S4. táblázat (Table S4): Az Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a légzés (“Respiration”) és a szterigmatocisztin klaszter RNS-seq adatai.

Az *A. fumigatus* kísérletek eredményeit kiegészítő táblázatok:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof101208>

S5. táblázat (Table S1): A kiválogatott gének RT-qPCR adatai.

S6. táblázat (Table S2): A génkészlet-dúsulási elemzés eredményei.

S7. táblázat (Table S3): A szelektált géncsoportok transzkripció adatai.

A génkészlet-dúsulási vizsgálatok összefoglaló táblázatai:

| A <i>sodB</i> és a <i>sod2</i> hiányának hatása normál körülmények között | | | |
|---|--|--------------------|---------------------|
| Biological Process | Folyamat | <i>A. nidulans</i> | <i>A. fumigatus</i> |
| Carbohydrate biosynthetic process | Szénhidrát bioszintézis folyamata | Alulszabályozott | |
| Glycolysis / Gluconeogenesis | Glikolízis / glükoneogenezis | Alulszabályozott | |
| Galactose metabolism | Galaktóz anyagcsere | Alulszabályozott | |
| Ethanol catabolic process | Etanol katabolikus folyamat | Alulszabályozott | |
| Acetaldehyde catabolic process | Acetaldehid lebontási folyamata | Alulszabályozott | |
| Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | Aminocukor- és nukleotidcukor-anyagcsere | Alulszabályozott | |
| Heme binding | Hemkötés | Alulszabályozott | Felül szabályozott |
| Mitotic cell cycle process | Mitotikus sejtciklus folyamata | Felül szabályozott | |
| DNA replication | DNS-replikáció | Felül szabályozott | |
| Translation | Fehérjeszintézis | Felül szabályozott | Felül szabályozott |
| Ribosome biogenesis | Riboszóma biogenezis | Felül szabályozott | Felül szabályozott |
| Cytosolic ribosome | Citoszolikus riboszóma | Felül szabályozott | |
| Endoplasmic reticulum | Endoplazmatikus retikulum | Felül szabályozott | |
| Protein localization to endoplasmic reticulum | Fehérje célba juttatása az endoplazmatikus retikulumba | Felül szabályozott | |
| Peroxisome | Peroxiszóma | Felül szabályozott | |
| Acyl-CoA biosynthetic process | Acil-CoA bioszintézis folyamata | Felül szabályozott | |
| Fatty acid beta-oxidation | Zsír sav béta-oxidáció | Felül szabályozott | |
| Mitochondrion | Mitokondrium | Felül szabályozott | |
| Protein localization to mitochondrion | Fehérje célba juttatása a mitokondriumba | Felül szabályozott | |
| Mitochondrion organization | Mitokondrium szerveződése | Felül szabályozott | Felül szabályozott |
| Mitochondrial transmembrane transport | Mitokondriális transzmembrán transzport | Felül szabályozott | Felül szabályozott |
| Mitochondrial inner membrane | Mitokondriális belső membrán | Felül szabályozott | |
| Mitochondrial matrix | Mitokondriális mátrix | Felül szabályozott | |
| Mitochondrial translation | Mitokondriális transzláció | Felül szabályozott | |
| Mitochondrial ribosome | Mitokondriális riboszóma | Felül szabályozott | |
| Mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex | Mitokondriális piruvát dehidrogenáz komplex | Felül szabályozott | |
| Citrate cycle (TCA cycle) | Citrátkör (TCA-ciklus) | Felül szabályozott | |
| Mitochondrial respiratory chain complex assembly | Mitokondriális légzési lánc komplex összeszerelése | Felül szabályozott | |
| Aerobic respiration | Aerob légzés | Felül szabályozott | |
| ATP synthesis coupled electron transport | Elektrontranszporttal összekapcsolt ATP-szintézis | Felül szabályozott | |
| Iron-sulfur cluster binding | Vas-kén klaszter kötése | Felül szabályozott | |
| Fungal-type vacuole | Gombatípusú vakuólum | Felül szabályozott | |
| Proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process | Proteaszóma ubiquitin-független fehérjebontó folyamata | Felül szabályozott | |
| Heme biosynthetic process | Hem bioszintézis folyamata | Felül szabályozott | |
| Xenobiotic catabolic process | Idegen anyagok (xenobiotikumok) lebontási folyamata | Felül szabályozott | |
| Amino acid transmembrane transporter activity | Aminosav transzmembrán transzporter aktivitás | | Alulszabályozott |
| Ammonium transmembrane transport | Ammónium transzmembrán transzport | | Alulszabályozott |
| Transition metal ion transport | Átmenetifém-ion transzport | | Alulszabályozott |
| Fungal-type cell wall | Gombatípusú sejtfallal | | Felül szabályozott |
| Cellular amino acid biosynthetic process | Sejtes aminosav-bioszintézis | | Felül szabályozott |
| Arginine biosynthetic process | Arginin bioszintézis | | Felül szabályozott |
| Aromatic amino acid family biosynthetic process | Aromás aminosav-család bioszintézise | | Felül szabályozott |
| Iron ion binding | Vas-ion-kötés | | Felül szabályozott |
| Secondary metabolite biosynthetic process | Másodlagos metabolit bioszintézis | | Felül szabályozott |
| Protein import into mitochondrial matrix | Fehérje bevitel a mitokondriális mátrixba | | Felül szabályozott |

A *sodB* és a *sod2* hiányának hatása oxidatív stressz alatt

| Biological Process | Folyamat | <i>A. nidulans</i> | <i>A. fumigatus</i> |
|---|---|---------------------------|----------------------------|
| Carbohydrate biosynthetic process | Szénhidrát bioszintézise | Alulszabályozott | |
| Glycolysis / Gluconeogenesis | Glikolízis / glükoneogenezis | Alulszabályozott | |
| Galactose metabolism | Galaktóz anyagcsere | Alulszabályozott | |
| Ethanol catabolic process | Etanol lebontási folyamat | Alulszabályozott | |
| Acetaldehyde catabolic process | Acetaldehid lebontása | Alulszabályozott | |
| Amino sugar and nucleotide sugar metabolism | Aminocukor- és nukleotidcukor-anyagcsere | Alulszabályozott | |
| Heme binding | Hemkötés | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| Mitotic cell cycle process | Mitotikus sejtciklus | Felülszabályozott | |
| DNA replication | DNS replikáció | Felülszabályozott | |
| Translation | Transzláció | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Ribosome biogenesis | Riboszóma biogenezis | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Cytosolic ribosome | Citoszolis riboszóma | Felülszabályozott | |
| Endoplasmic reticulum | Endoplazmatikus retikulum | Felülszabályozott | |
| Protein localization to endoplasmic reticulum | Fehérje célba juttatása az endoplazmatikus retikulumba | Felülszabályozott | |
| Peroxisome | Peroxiszóma | Felülszabályozott | |
| Acyl-CoA biosynthetic process | Acil-koenzim-A bioszintézis | Felülszabályozott | |
| Fatty acid beta-oxidation | Zsírsvav béta-oxidáció | Felülszabályozott | |
| Mitochondrion | Mitokondrium | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Protein localization to mitochondrion | Fehérje célba juttatása a mitokondriumba | Felülszabályozott | |
| Mitochondrion organization | Mitokondrium szerveződése | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial transmembrane transport | Mitokondriális membrántranszport | Felülszabályozott | |
| Mitochondrial inner membrane | Mitokondrium belső membránja | Felülszabályozott | |
| Mitochondrial matrix | Mitokondriális mátrix | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial translation | Mitokondriális transzláció | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial ribosome | Mitokondriális riboszóma | Felülszabályozott | |
| Mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex | Mitokondriális piruvát-dehidrogenáz komplex | Felülszabályozott | |
| Citrate cycle (TCA cycle) | Citrátciklus (TCA-ciklus) | Felülszabályozott | |
| Mitochondrial respiratory chain complex assembly | Mitokondriális elektrontranszport-lánc komplexének összeszerelése | Felülszabályozott | |
| Aerobic respiration | Aerob légzés | Felülszabályozott | |
| ATP synthesis coupled electron transport | ATP-szintézis elektrontranszporttal összekapcsolva | Felülszabályozott | |
| Iron-sulfur cluster binding | Vas-kén klaszter kötése | Felülszabályozott | |
| Fungal-type vacuole | Gombákra jellemző vakuólum | Felülszabályozott | |
| Proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process | Ubiquitin-független proteasomális fehérjelebontás | Felülszabályozott | |
| Heme biosynthetic process | Hem bioszintézis folyamata | Felülszabályozott | |
| Xenobiotic catabolic process | Idegen anyagok lebontási folyamata | Felülszabályozott | |
| Cytoskeleton | Citoszkeleton | | Alulszabályozott |
| Amino acid transmembrane transporter activity | Aminosav transzmembrán transzporter aktivitás | | Alulszabályozott |
| Ammonium transmembrane transport | Ammónium transzmembrán transzport | | Alulszabályozott |
| 4 iron, 4 sulfur cluster binding | 4 Fe, 4 S klaszter kötése | | Alulszabályozott |
| Mitochondrial membrane | Mitokondriális membrán | | Felülszabályozott |
| Protein targeting to mitochondrion | Fehérje bejuttatása a mitokondriumba | | Felülszabályozott |
| Mitochondrial transport | Mitokondriális transzport | | Felülszabályozott |
| Cytochrome complex assembly | Citokróm komplex összeállítása | | Felülszabályozott |

| MSB kezelés hatása a referencia törzsrekre | | | |
|--|---|--------------------|---------------------|
| Biological Process | Folyamat | <i>A. nidulans</i> | <i>A. fumigatus</i> |
| Conidium development | Konídiumfejlődés | Alulszabályozott | |
| Regulation of sexual sporulation | Szexuális sporuláció szabályozása | Alulszabályozott | |
| Filamentous growth | Fonális növekedés | Alulszabályozott | |
| Fungal-type cell wall organization | Gombatípusú sejtfal-szerveződés | Alulszabályozott | |
| Mitotic cell cycle | Mitotikus sejtciklus | Alulszabályozott | |
| Meiosis | Meiózis | Alulszabályozott | |
| DNA replication | DNS replikáció | Alulszabályozott | |
| Translation | Transzláció | Alulszabályozott | |
| Ribosome biogenesis | Riboszóma biogenezis | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| Endoplasmic reticulum | Endoplazmatikus retikulum | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| Golgi apparatus | Golgi-készülék | Alulszabályozott | |
| GPI anchor biosynthetic process | GPI horgony bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Protein folding | Fehérjehajtogatás | Alulszabályozott | |
| Protein O-linked glycosylation | O-kapcsolt fehérjeglizoziláció | Alulszabályozott | |
| Protein N-linked glycosylation via asparagine | N-kapcsolt glikoziláció aszparaginon keresztül | Alulszabályozott | |
| Phospholipid biosynthetic process | Foszfolipid bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Glycolipid biosynthetic process | Glikolipid bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Mitochondrion | Mitochondrium | Alulszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial gene expression | Mitochondriális géneexpresszió | Alulszabályozott | |
| Mitochondrial translation | Mitochondriális transzláció | Alulszabályozott | |
| Mitochondrial ribosome | Mitochondriális riboszóma | Alulszabályozott | |
| Acetyl-CoA biosynthetic process | Acetil-koenzim A bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Citrate cycle (TCA cycle) | Citrátciklus (TCA ciklus) | Alulszabályozott | |
| Aerobic respiration | Aerob légzés | Alulszabályozott | Felülszabályozott |
| Glycolysis / Gluconeogenesis | Glikolízis / Glükoneogenezis | Alulszabályozott | |
| Ethanol catabolic process | Etanol lebontási folyamat | Alulszabályozott | |
| Cellular amino acid biosynthetic process | Sejtes aminosav-bioszintézis folyamata | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Valine, leucine and isoleucine biosynthesis | Valin, leucin és izoleucin bioszintézis | Felülszabályozott | |
| Cellular response to oxidative stress | Sejtes válasz az oxidatív stresszre | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Glutathione metabolic process | Glutation anyagcsere | Felülszabályozott | |
| Proteolysis involved in cellular protein catabolic process | Fehérjebontás sejtes katabolikus folyamatban | Felülszabályozott | |
| Ubiquitin-dependent protein catabolic process | Ubiquitin-függő fehérjebontás | Felülszabályozott | |
| Autophagy | Autofágia | Felülszabályozott | |
| Macroautophagy | Makroautofágia | Felülszabályozott | |
| Lysosomal microautophagy | Lizoszomális mikroautofágia | Felülszabályozott | |
| Autophagy of nucleus | Sejtmag autofágiája | Felülszabályozott | |
| Mitochondrion | Mitochondrium | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrion disassembly | Mitochondrium lebontása | Felülszabályozott | |
| Autophagy of mitochondrion | Mitochondrium autofágiája | Felülszabályozott | |
| Mitochondrial respiratory chain complex assembly | Mitochondriális légzési lánc komplex összeszerelése | Felülszabályozott | |
| Iron-sulfur cluster assembly | Vas-kén klaszter összeállítása | Felülszabályozott | |
| Cell wall organization or biogenesis | Sejtfal szerveződése vagy biogenezise | | Alulszabályozott |
| N-acetylglucosamine metabolic process | N-acetil-glükózamin anyagcsere-folyamat | | Alulszabályozott |
| Aromatic amino acid family catabolic process | Aromás aminosav család katabolikus folyamata | | Alulszabályozott |
| Heme binding | Hemkötés | | Alulszabályozott |
| Lipid biosynthetic process | Lipidszintézis folyamata | | Alulszabályozott |
| Steroid biosynthetic process | Szteroid bioszintézis folyamata | | Alulszabályozott |
| Lysine biosynthetic process | Lizin bioszintézis | | Felülszabályozott |
| Branched-chain amino acid biosynthetic process | Elágazó láncú aminosavak bioszintézise | | Felülszabályozott |
| Glycolytic process | Glikolitikus folyamat | | Felülszabályozott |
| Glycogen metabolic process | Glikogén anyagcsere-folyamat | | Felülszabályozott |
| Heme biosynthetic process | Hembioszintézis | | Felülszabályozott |
| Sulfur compound binding | Kénvegyületekhez kötődés | | Felülszabályozott |
| Pigment biosynthetic process | Pigment bioszintézis folyamata | | Felülszabályozott |
| Response to superoxide | Válasz a szuperoxidra | | Felülszabályozott |
| Peroxidase activity | Peroxidáz aktivitás | | Felülszabályozott |
| Antioxidant activity | Antioxidáns aktivitás | | Felülszabályozott |
| Pentose-phosphate shunt | Pentóz-foszfát elágazás | | Felülszabályozott |
| Mitochondrial intermembrane space | Mitochondrium belső membrántere | | Felülszabályozott |
| Respiratory chain complex IV assembly | Légzési lánc IV. komplexének összeszerelése | | Felülszabályozott |
| Oxidative phosphorylation | Oxidatív foszforiláció | | Felülszabályozott |
| ATP synthesis coupled proton transport | ATP-szintézishez kapcsolt protontranszport | | Felülszabályozott |
| Pyruvate metabolic process | Piruvát anyagcsere-folyamat | | Felülszabályozott |

| MSB kezelés hatása a mutáns törzsrekre | | | |
|--|--|--------------------|---------------------|
| Biological Process | Folyamat | <i>A. nidulans</i> | <i>A. fumigatus</i> |
| Conidiophore development | Konidiumtartó fejlődése | Alulszabályozott | |
| Hyphal growth | Hifák növekedése | Alulszabályozott | |
| DNA replication | DNS replikáció | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| Translation | Transzláció | Alulszabályozott | Felülszabályozott |
| Ribosome biogenesis | Riboszóma biogenezis | Alulszabályozott | |
| Endoplasmic reticulum | Endoplazmatikus retikulum | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| Golgi apparatus | Golgi-készülék | Alulszabályozott | Alulszabályozott |
| GPI anchor biosynthetic process | GPI horgony bioszintézise | Alulszabályozott | |
| Protein folding | Fehérjehajtogatás | Alulszabályozott | |
| Protein N-linked glycosylation via asparagine | N-kapcsolt glikoziláció aszparaginon keresztül | Alulszabályozott | |
| Mannosylation | Mannoziláció | Alulszabályozott | |
| Ergosterol biosynthetic process | Ergosterol bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Glycolipid biosynthetic process | Glikolipid bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Fatty acid biosynthetic process | Zsírsvav bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Mitochondrion | Mitochondrium | Alulszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial matrix | Mitochondriális mátrix | Alulszabályozott | Felülszabályozott |
| Mitochondrial gene expression | Mitochondriális génexpresszió | Alulszabályozott | |
| Mitochondrial translation | Mitochondriális transzláció | Alulszabályozott | |
| Mitochondrial ribosome | Mitochondriális riboszóma | Alulszabályozott | |
| Acetyl-CoA biosynthetic process | Acetil-koenzim A bioszintézis | Alulszabályozott | |
| Aerobic respiration | Aerob légzés | Alulszabályozott | |
| ATP synthesis coupled electron transport | ATP-szintézis elektrontranszporttal kapcsolva | Alulszabályozott | |
| Glycolysis / Gluconeogenesis | Glikolízis / Glükoneogenezis | Alulszabályozott | |
| Ethanol catabolic process | Etanol katabolizmus | Alulszabályozott | |
| Alpha-amino acid biosynthetic process | Alfa-aminosav bioszintézis | Felülszabályozott | |
| Ammonium transport | Ammóniumtranszport | Felülszabályozott | |
| Branched-chain amino acid biosynthetic process | Elágazó láncú aminosavak bioszintézise | Felülszabályozott | |
| Cell wall biogenesis | Sejtfal biogenezis | Felülszabályozott | |
| Cellular response to oxidative stress | Sejtes válasz az oxidatív stresszre | Felülszabályozott | |
| Chitin biosynthetic process | Kitin bioszintézis | Felülszabályozott | |
| Response to heat | Hőstresszre adott válasz | Felülszabályozott | |
| Mitotic cell cycle | Mitotikus sejtciklus | Felülszabályozott | |
| Cellular response to DNA damage stimulus | Sejtes válasz a DNS-károsodásra | Felülszabályozott | |
| Meiosis | Meiózis | Felülszabályozott | |
| Response to nutrient levels | Tápanyagok szintjére adott válasz | Felülszabályozott | |
| Autophagy | Autofágia | Felülszabályozott | |
| Autophagy of nucleus | Sejtmag autofágiája | Felülszabályozott | |
| Ubiquitin-dependent protein catabolic process | Ubiquitin-függő fehérjelebontás | Felülszabályozott | |
| Mitochondrion organization | Mitochondrium szerveződése | Felülszabályozott | Felülszabályozott |
| Iron-sulfur cluster assembly | Vas-kén klaszter összeállítása | Felülszabályozott | |
| Phosphorelay signal transduction system | Foszforelé jelátviteli rendszer | Felülszabályozott | |
| Protein kinase activity | Fehérje-kináz aktivitás | Felülszabályozott | |
| Trehalose catabolic process | Trehalóz lebontása | Felülszabályozott | |
| Xenobiotic transport | Idegen anyagok transzportja | Felülszabályozott | |
| Mitotic cell cycle process | Mitotikus sejtciklus folyamata | | Alulszabályozott |
| Cytoskeleton | Citoszkeleton | | Alulszabályozott |
| Amino acid transmembrane transporter activity | Aminosav-transzmembrán transzporter aktivitás | | Alulszabályozott |
| Cellular amino acid biosynthetic process | Sejtes aminosav-bioszintézis | | Alulszabályozott |
| Iron ion binding | Vasion megkötése | | Alulszabályozott |
| Heme binding | Hemkötés | | Alulszabályozott |
| 4 iron, 4 sulfur cluster binding | 4 vas, 4 kén klaszter megkötése | | Alulszabályozott |
| Succinate dehydrogenase activity | Szukcinát dehidrogenáz aktivitás | | Alulszabályozott |
| Lipid biosynthetic process | Lipidszintézis folyamata | | Alulszabályozott |
| Steroid biosynthetic process | Szteroid bioszintézis folyamata | | Alulszabályozott |
| Proteasome core complex | Proteaszóma magkomplex | | Alulszabályozott |
| Proteolysis | Proteolízis | | Alulszabályozott |
| Ribosome | Riboszóma | | Felülszabályozott |
| Response to oxidative stress | Válasz az oxidatív stresszre | | Felülszabályozott |
| Antioxidant activity | Antioxidáns aktivitás | | Felülszabályozott |
| Mitochondrial membrane | Mitochondriális membrán | | Felülszabályozott |
| Protein targeting to mitochondrion | Fehérjék célba juttatása a mitokondriumba | | Felülszabályozott |
| Mitochondrial transport | Mitochondriális transzport | | Felülszabályozott |
| ATP synthesis coupled proton transport | ATP-szintézishez kapcsolt protontranszport | | Felülszabályozott |

15. FÜGGELÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmükben.